

Aus der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Lehrstuhl: Professor Dr. W. Leidl

und dem Besamungsverein Neustadt a.d. Aisch e.V.

Leitender fachtechnischer Direktor: Dr. Rudolf Hahn

Untersuchungen von TGN₂-Bullensperma von der
Lagerung im Container bis zur Insemination unter
Berücksichtigung definierter künstlicher Noxen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Wolfgang Klein
aus
Uffenheim

München 1985



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Lehrstuhl: Professor Dr. W. Leidl

und dem Besamungsverein Neustadt a.d. Aisch e.V.

Leitender fachtechnischer Direktor: Dr. Rudolf Hahn

Untersuchungen von TGN₂-Bullensperma von der
Lagerung im Container bis zur Insemination unter
Berücksichtigung definierter künstlicher Noxen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Wolfgang Klein
aus
Uffenheim

München 1985

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. W. Leidl

Referent: Prof. Dr. W. Leidl

Korreferent: Prof. Dr. J. Meyer

Tag der Promotion: 22. Februar 1985

Meinen Eltern
und meiner Frau

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. LITERATUR	3
2.1. Zusammenhänge zwischen Spermaqualität und Befruchtungsergebnissen	3
2.1.1. Morphologie des Akrosoms	4
2.1.2. Motilität	6
2.1.3. Adenosinnucleotide und "Adenylate energy charge" (AEC)	7
2.2. Adenosinnucleotide als Parameter für die Spermienvitalität bei der Untersuchung spermatologischer Fragestellungen	10
2.3. Bedeutung des Auftauens und der Temperaturen nach dem Auftauen für die Spermaqualität und Befruchtungsfähigkeit von Bullensperma	12
2.4. Temperaturwechsel bei der Handhabung von TGN ₂ -Bullensperma im Container und sein Einfluß auf die Spermaqualität	20
2.5. Elektrowärme mit Mikrowellen	22
3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	24
3.1. Material und Methoden	24
3.1.1. Herkunft des Samens	24
3.1.2. Dichtebestimmung	25
3.1.3. Bestimmung der Motilität	25
3.1.4. Beurteilung der Akrosommorphologie	26
3.1.5. Adenosinnucleotidmessung mit dem Biolumineszenzverfahren	26
3.1.6. Thermoresistenztest	27
3.1.7. Temperaturmessung im Inneren der Paillette mit einem Thermoelement	27

3.1.8.	Einfluß unterschiedlicher Auftauverfahren auf die Spermaqualität	28
3.1.8.1.	Sperma	29
3.1.8.2.	Auftauen im Wasserbad	29
3.1.8.3.	Auftauen mit dem Spermatherm nach Dr. Schille	30
3.1.8.4.	Auftauen mit Mikrowellen, ein "Screening-Test"	30
3.1.9.	Einfluß unterschiedlicher Auftauverfahren mit nachfolgenden Manipulationen auf die Spermaqualität	32
3.1.9.1.	Sperma	33
3.1.9.2.	Versuchsaufbau	33
3.1.10.	Einfluß unterschiedlicher Auftauverfahren mit demselben Belastungstest nach dem Auftauen auf die Spermaqualität	34
3.1.10.1.	Sperma	34
3.1.10.2.	Versuchsaufbau	35
3.1.11.	Einfluß von Temperaturen unter dem Nullpunkt auf die Spermaqualität	35
3.1.12.	Temperaturverlauf im Inneren einer Paillette bei der Handhabung wie in der Besamungspraxis	37
3.1.12.1.	Auftaumethoden	38
3.1.12.2.	Einfluß der Bewegung der Paillette im Wasserbad auf den Temperaturverlauf	39
3.1.12.3.	Einfluß des Abtrocknens der Paillette auf den Temperaturverlauf	39
3.1.13.	Besamungsversuch: Einfluß von zwei verschiedenen Auftauverfahren auf die Befruchtungsfähigkeit von TGN ₂ -Bullensperma	40
3.1.13.1.	Versuchsmaterial	41
3.1.13.2.	Versuchsaufbau	41
3.1.14.	Statistische Methoden	42

	Seite
3.2.	Ergebnisse 43
3.2.1.	Einfluß unterschiedlicher Auftauverfahren mit und ohne Variation der Temperaturen nach dem Auftauen auf die Spermaqualität 43
3.2.2.	Auftauen mit Mikrowellen 49
3.2.3.	Einfluß der Auftaumethode mit anschließender Belastung auf Spermaqualität und Temperaturverlauf 51
3.2.4.	Einfluß von Temperaturschwankungen unter dem Nullpunkt auf die Spermaqualität 54
3.2.5.	Temperaturmessungen im Inneren einer Paillette mit einem Thermoelement 57
3.2.5.1.	Temperaturverlauf und Auftauzeiten bei unterschiedlichen Auftaumethoden 57
3.2.5.2.	Einfluß der Bewegung der Paillette während des Auftauens 61
3.2.5.3.	Einfluß des Abtrocknens nach dem Auftauen im Wasserbad 61
3.2.6.	Einfluß verschiedener Auftauverfahren auf die Befruchtungsergebnisse 62
3.2.7.	Korrelationen zwischen Motilität, ATP-Gehalt und AEC-Wert von aufgetautem TGN ₂ -Bullensperma 65
4.	DISKUSSION 66
5.	ZUSAMMENFASSUNG 76

6.	SUMMARY	79
	"Investigations of deep-frozen bull semen from preservation in a container to insemination with special consideration of defined experimental noxes"	
7.	LITERATURVERZEICHNIS	82
	Lebenslauf	

1. EINLEITUNG

Die künstliche Besamung stellt heute einen bedeutenden und unverzichtbaren Faktor innerhalb der Rinderproduktion dar. Durch ständige Verbesserungen auf dem Gebiet der Spermatechnologie, wie z.B. durch die Tiefgefrierung in flüssigem Stickstoff und die Konfektionierung in Pailletten, hat sich ihre praktische Durchführung zu einem weltweit angewandten Routineverfahren entwickelt. Von entscheidender Bedeutung innerhalb dieses Verfahrens ist die Handhabung des Tiefgefriersamens in der Besamungspraxis mit der Entnahme aus dem Container, dem Auftauprozeß und der Aufbewahrung des Samens bis zur Insemination. Von ihr ist, neben der Eignung des Samenspenders, der Samengewinnung und -verarbeitung im wesentlichen der Befruchtungserfolg abhängig. Im Gegensatz zu der Verdünnung, der Konfektionierung und der Tiefgefrierung im Labor, die unter standardisierten Bedingungen und routinemäßigen Qualitätskontrollen erfolgen, unterliegt der Tiefgefriersamen in der Praxis wechselnden Umweltbedingungen und der jeweiligen Sorgfalt des Besamers. Das umfangreiche Material, das zur Handhabung des Tiefgefriersamens publiziert wurde (SAACKE 1978, SENGER 1980, BROWN et al. 1982, PAPA 1982), zeigt deutlich die Schwierigkeiten auf, eine Vorschrift oder Empfehlung zu geben, die alle Einflußfaktoren berücksichtigt und zu einer optimalen Spermaqualität zum Zeitpunkt der Insemination führt. In dieser Arbeit wurden daher erneut die drei Problembereiche der Behandlung des Tiefgefriersamens in der Praxis aufgegriffen, und zwar die Handhabung im Container, das Auftauen und die nachfolgende Aufbewahrung, wobei

der Auftauprozess auf Grund seiner entscheidenden Bedeutung für die Spermaqualität den Schwerpunkt der Untersuchungen bildete.

2. LITERATUR

2.1. Zusammenhänge zwischen Spermaqualität und Befruchtungsergebnissen

Seit Jahrzehnten wird in der spermatologischen Diagnostik nach Merkmalen gesucht, die ein enges Verhältnis zu den Konzeptionsraten aufweisen. Trotz zum Teil signifikanter Korrelationen gestatten die meist geringen Beziehungen keine Aussage über die Fertilisationsfähigkeit des Samens. KRAUSE (1966), der in seinen Untersuchungen die Befunde von 42 verschiedenen Sperma Merkmalen pro Ejakulat erhoben hatte, konnte kein Kriterium finden, das eine unmittelbare Beurteilung eines Ejakulates hinsichtlich seiner Befruchtungsfähigkeit zuläßt. PAPA (1982) zog aus den ähnlichen Beobachtungen die Schlußfolgerung, daß die häufig postulierte Beziehung zwischen Sperma Merkmal und Befruchtungsergebnissen polyfaktoriell überlagert werden kann. Faktoren, die in ihrem Zusammenspiel zu fehlenden Korrelationen oder niedrigen Korrelationskoeffizienten beitragen können, sind in der Literatur zahlreich aufgeführt. PACE et al. (1981) machen dafür verantwortlich, daß normalerweise mit einem erheblichen Überschuß an intakten Samenzellen pro Besamungsdosis gearbeitet wird und somit die qualitativen Unterschiede durch die quantitativen kompensiert werden. Offensichtlich gibt es für die meisten Sperma charakteristika Grenzwerte für das Erreichen einer optimalen Fertilität. Eine Verbesserung der Spermaqualität über diesen Punkt hinaus führt zu keiner weiteren Steigerung der Befruchtungsergebnisse (SALISBURY und VANDEMARK 1961).

Nach HAHN und KRAUSE (1964) bewirkt die Selektion von Bullen hinsichtlich ihrer Samenbeschaffenheit eine Angleichung der Spermabefunde, wodurch größere Variationen ausgeschaltet werden. Sie halten daher eine statistische Berechnung von Korrelationen nur für vertretbar, wenn selektive Maßnahmen ausgeschlossen werden.

SAACKE et al. (1980) sehen die Schwierigkeit in einer genauen Erfassung der Fruchtbarkeit. LOTTHAMMER (1980) weist noch auf den Einfluß der Fruchtbarkeitslage verschiedener Herden hin. KRAUSE (1966) und REINHARD (1980) empfehlen daher nur solche Ejakulate für die Konservierung und den Besamungseinsatz zu verwenden, die bei allen spermatologischen Untersuchungsmerkmalen "normale Befunde" aufweisen.

2.1.1. Morphologie des Akrosoms

Das Akrosom oder die Kopfkappe und deren lysosomale Enzymausstattung spielen eine wichtige Rolle bei der Penetration des Spermiums durch die Eihüllen und somit bei der Befruchtung.

SAACKE und WHITE (1972) beschrieben die Kopfkappe als eine allseitig geschlossene Doppelmembran, die beim Rind der vorderen Hälfte des Spermienkopfes kappenartig aufsitzt und bis zum Nuclearring reicht. HAFEZ (1980) spricht hier von einem dünn-schichtigen membranösen Sack. Zwischen dessen äußerer und innerer Doppelmembran befindet sich eine Mittellage, der subakrosomale Raum, der im Elektronenmikroskop optisch sehr dicht erscheint. Den für

die Kopfkappendiagnostik wichtigsten Teil stellt der apikale Rand dar, der als Verdickung und hakenförmige Abwärtsbiegung der Mitellage beschrieben wird. Die äußere Akrosomenmembran ist zusätzlich von einer Plasmamembran bedeckt, die das ganze Spermium umhüllt.

Die Beurteilung der Kopfkappe kann sowohl an fixierten mit verschiedenen Färbungsmethoden (z.B. nach KARRAS 1950, WELLS und AWA 1970) behandelten Spermien, als auch an unfixierten und ungefärbten mit einer salinischen Formollösung immobilisierten Spermien (nach HANCOCK 1952 oder DOTT und FORSTER 1975) durchgeführt werden. Mit der letztgenannten Methode ist im Phasenkontrastmikroskop eine feinere morphologische Typendifferenzierung des Akrosoms möglich (SAACKE 1970).

Die Veränderungen der Kopfkappe und Zellmembran im Phasenkontrastmikroskop, die charakteristisch sind für die Spermienalterung und/oder -schädigung, beschrieben unter anderem SAACKE und MARSHALL (1968), SAACKE (1970) und PURSEL et al. (1972). Zuerst kommt es durch Anschwellung der vorderen Kopfkappe zum Verlust der scharfen Abgrenzung des apikalen Randes, dadurch wird das Äquatorialssegment sichtbar. Eine weitere Schwellung führt dann zur Sprengung und vollständigen Ablösung der Kopfkappe, so daß nur noch das Äquatorialssegment zu erkennen ist. Diese fließend ineinander übergehenden Veränderungen werden für die praktische Beurteilung häufig in drei bis fünf Gruppen eingeteilt, PAPA (1982) benutzte z.B. folgende Nomenklatur:

NAR = Normaler Apikaler Rand

GAR = Geschwollener Apikaler Rand

AIA = Akrosom In Ablösung

AA = Abgelöstes Akrosom

Positive Korrelationen zwischen der Akrosomintegrität und den Befruchtungsergebnissen konnten HANCOCK (1952), SAACKE et al. (1968), SAACKE und WHITE (1972) und REINHARD (1980) nachweisen. Keine Beziehungen fanden dagegen KRÜGER (1972), HEUER (1980) und PAPA (1982). WEITZE (1981) folgerte aus seinen Versuchen mit Kaninchensperma, daß für eine erfolgreiche Befruchtung eine bestimmte Anzahl an Spermien mit intakter Motilität und Akrosomstruktur vorhanden sein muß.

2.1.2. Motilität

Die Motilität als Ausdruck der Stoffwechselaktivität einer Samenzelle wird als ihre elementarste Lebensäußerung betrachtet. Ihre subjektive Beurteilung ist bis heute ein wichtiges Hilfsmittel sowohl in der spermatologischen Diagnostik als auch in der routinemäßigen Qualitätskontrolle der Besamungsstationen geblieben.

Ihre Bedeutung für die Befruchtung faßten AMELAR et al. (1980) in einem Übersichtsreferat zusammen. Danach können immotile Spermien, ob lebend oder tot, den Cervikalschleim nicht passieren. Ebenso ist ein kräftiges Schlagen des Spermienchwanzes für die

Penetration des Spermienkopfes durch die Corona radiata notwendig. Auch die Bewegungsform der Spermien ist hier von Bedeutung, d.h. sie müssen eine geradlinige Vorwärtsbewegung aufweisen.

In zahlreichen Arbeiten wurde daher die Beziehung zwischen Motilität und Befruchtungsergebnissen untersucht (KRAUSE 1966, SAACKE et al. 1980, WEITZE 1981, PAPA 1982). Trotz der oft fehlenden Korrelation oder niedrigen Korrelationskoeffizienten ist grundsätzlich eine enge Beziehung nicht in Frage zu stellen.

2.1.3. Adenosinnucleotide und "Adenylate energy charge" (AEC)

Die Adenosinnucleotide ATP, ADP und AMP stellen, wie bei anderen stoffwechselaktiven Zellen, auch bei den Spermien das Energiereservoir dar. Die unmittelbare Energiequelle für die Spermienmotilität ist aber das ATP (SATIR 1979). Die Resynthese des verbrauchten ATP durch Phosphorylierung von AMP und ADP erfolgt in den Mitochondrien, die an der Basis des Spermienschwanzes lokalisiert sind (NEVO und RIKMENSPOEL 1969). Die Umsetzung der chemischen in die mechanische Energie wird durch die Hydrolyse des ATP zu ADP durch die ATP-ase Dynein initiiert, die ein Aneinandervorbeigleiten der Microtubuli des Spermienschwanzes bewirkt und damit die Schlängelbewegung des Flagellum auslöst (GIBBONS und GIBBONS 1979). Die Konzentration des Adenosintriphosphates bestimmt die Schlagfrequenz (AMELAR et al. 1980).

Seit KÄHN (1981a, 1981b) eine relativ einfache Biolumineszenz-methode entwickelte, mit der in kurzer Zeit und ohne großen apparativen Aufwand alle drei Adenosinnucleotide in den Spermien gemessen werden können, steht ein objektiv erfaßbarer Parameter für deren Vitalität und Motilität zur Verfügung.

Eine gute Korrelation zwischen dem ATP-Gehalt und dem Schätzwert für die Motilität stellten FOULKES und MacDONALD (1979), LEIDL (1980), KÄHN (1981a), KÄHN et al. (1982) und VELEZ CUEVAS (1982) fest.

Die in der Literatur gefundenen Werte für Nativsperma von Bullen lagen für ATP zwischen 5,0 und 76,5, für ADP zwischen 4,1 und 12,0 und für AMP zwischen 2,0 und 13,5 nMol/10⁸ Spermien (NEWTON und ROTHSCCHILD 1961, BRACKETT und WILLIAMS 1967, BROOKS 1970, 1971, HOSKINS 1972, PRINZEN 1977, FOULKES und MacDONALD 1979, PFETSCH 1979, KÄHN 1981a, KÄHN et al. 1982, VELEZ CUFVAS 1982, BERGER 1983).

Die energetische Ladung von Zellen wird durch die von ATKINSON und WALTON (1967) eingeführte "Adenylsäure-Energie-Ladung" (AEC) besser wiedergegeben als durch die Anteile der einzelnen Nucleotide (SWEDES et al. 1975). Der AEC-Wert wird nach folgender Formel berechnet.

$$\text{AEC} = \frac{\text{ATP} + 1/2 \text{ ADP}}{\text{ATP} + \text{ADP} + \text{AMP}}$$

Da die Zellen unter physiologischen Lebensbedingungen die Konzentrationen ihrer Adenosinnucleotide in engen Grenzen halten, kann jede Veränderung dieses Gleichgewichtes als Ausdruck veränderter Umweltbedingungen interpretiert werden oder bei Unterschreiten einer bestimmten Grenze auf den Zelltod geschlossen werden (CHAPMAN et al. 1971, CHAPMAN und ATKINSON 1977, HOLM-HANSEN und KARL 1978).

Im nativen Sperma von Bullen ermittelten KÄHN et al. (1982) einen AEC-Wert von durchschnittlich 0,68, VELEZ CUEVAS (1982) von 0,63 und BERGER (1983) von 0,50 - 0,65.

Untersuchungen über Beziehungen der Adenosinnucleotide zur Fruchtbarkeit von Bullensperma liegen bisher nur von BERGER (1983) vor. Er setzte neben den gebräuchlichen Parametern der Samenqualität den Adenosinnucleotidgehalt in Nativ-Ejakulaten, im Tiefgefriersperma nach dem Auftauen sowie nach Wärmebelastung mit der 60/90 Tage Non-Return-Rate in Beziehung. Er fand, daß der AEC-Wert für die Spermaaburteilung hinsichtlich ihres Befruchtungsvermögens den Werten für die einzelnen Nucleotide überlegen ist. Dies traf vor allem für die AEC-Werte im nativen Sperma (positive Korrelation) sowie nach Wärmebelastung des Tiefgefrierspermas zu (negative Korrelation). Am besten geeignet für die Beurteilung des Befruchtungsvermögens erwies sich aber die AEC-Differenz (= Werte vor dem Tiefgefrieren minus Werte nach dem Tiefgefrieren, Auftauen und Wärmebelastung) mit einem Korrelationskoeffizienten (r) von + 0,1785 ($P \leq 0,001$). Verantwortlich

für die gefundenen niedrigen Korrelationskoeffizienten macht er vor allem die strenge Vorselektion der Bullen und der zur Konservierung verwendeten Ejakulate mit der daraus resultierenden geringen Variabilität der einzelnen Parameter.

2.2. Adenosinnucleotide als Parameter für die Spermiovitalität bei der Untersuchung spermatologischer Fragestellungen

Die subjektiv erfaßte Motilität der Samenzellen ist stets wichtigster Parameter für die Spermaqualität sowohl in der spermatologischen Diagnostik als auch in der Beurteilung neuer Spermientechnologien gewesen. Mit der Biolumineszenzmethode stehen nun die Adenosinnucleotide als weitere Parameter zur Verfügung, die relativ schnell und vor allem objektiv die Vitalität erfassen.

PRINZEN (1977), der erstmals die ATP-Konzentration auf ihre Eignung als objektiv erfaßbares Merkmal überprüfte, wählte als Modell den Auftauprozess. Er untersuchte hier den Einfluß der Auftautemperatur von +10°C bis +60°C bei konstanter Auftauzeit. Das beste Ergebnis für die geschätzte Motilität fand er bei einer Temperatur von +50°C, was er anhand der ATP-Konzentration bestätigen und somit objektivieren konnte.

FOULKES und MacDONALD (1979) untersuchten die Veränderungen der Adenosinnucleotidkonzentrationen im Verlauf der Tiefgefrierkon-

servierung. Sie fanden einen Abfall des ATP-Gehaltes von $76,5 \pm 38,2 \text{ nMol}/10^8$ Spermien im nativen Sperma auf $10,00 \pm 4,74 \text{ nMol}/10^8$ Spermien nach dem Auftauen. Die beiden ATP-Werte waren mit den korrespondierenden Motilitätswerten eng korreliert ($r = + 0,857$, $P \leq 0,02$ und $r = + 0,607$, $P \leq 0,05$).

KÄHN (1981a) und KÄHN et al. (1982) verwendeten dann erstmalig alle drei Adenosinnucleotide als Parameter für die Untersuchung der Tiefgefrierung. Sie stellten fest, daß Noxen wie die unfraktionierte Glycerinzugabe und die Abkühlung der Spermien auf $+5^\circ\text{C}$ deutlicher im ATP-Rückgang als im Motilitätsabfall zu erkennen waren. Weiterhin beobachteten sie eine Verschiebung des Verhältnisses der drei Adenosinnucleotide im Verlauf der Tiefgefrierkonservierung. Während der ATP-Gehalt im nativen Sperma den ADP- und AMP-Gehalt weit überwog und im Verlauf der einzelnen Phasen der Tiefgefrierkonservierung stetig abnahm, stiegen der ADP-Gehalt leicht und der AMP-Gehalt stark an. Nach dem Auftauen lagen sie beide über den Werten für ATP. Infolgedessen fiel der AEC-Wert von 0,63 im nativen Sperma auf 0,25 nach dem Auftauen.

VELEZ CUEVAS (1982) variierte in seinen Untersuchungen über die Tiefgefrierung die Endverdünnung und die Dauer der Adaptationszeit. Er fand eine Beeinflussung des ATP-Wertes durch die Spermienkonzentration und folgerte daraus, daß die ATP-Bestimmung nur für Fragestellungen beim Tiefgefrierverfahren geeignet ist, wenn die Proben gleiche Spermiedichte besitzen. Weiterhin ermittelte er eine gute Beziehung zwischen dem AEC-Wert von aufgetauten Spermaproben zu deren geschätzter Motilität.

Von den Autoren wurde übereinstimmend festgestellt, daß die Adenosinnucleotidbestimmung mit Hilfe der Biolumineszenz zur Beurteilung von Samenproben bei spermatologischen Fragestellungen geeignet ist.

2.3. Bedeutung des Auftauens und der Temperaturen nach dem Auftauen für die Spermaqualität und Befruchtungsfähigkeit von Bullensperma

Auf Grund des hohen Oberflächen-Volumen-Verhältnisses ist die Paillette besonders empfindlich gegenüber Temperaturveränderungen. Solche Schwankungen werden verursacht durch die Umlagerung des Samens von Container zu Container, durch die Manipulationsart und -häufigkeit des Samens im Container, durch das Auftauwasserbad und durch die Exposition nach dem Auftauen.

Unter den hier aufgeführten Punkten kommt dem Auftauprozess die größte Bedeutung zu. In zahlreichen Untersuchungen konnte aufgezeigt werden, daß ein schnelles Auftauen im Wasserbad in Bezug auf die Spermienparameter und Befruchtungsfähigkeit der Spermien allen anderen Methoden, wie z.B. dem Auftauen in der Hand, in der Luft u.s.w., überlegen ist (PICKETT und BERNDSTON 1974, ENNEN et al. 1976, SENGGER 1980).

ALMQUIST (1976a) untersuchte den Einfluß steigender Auftautemperaturen auf die Motilität und Akrosomintegrität, wobei er Wasser-

bäder von +35°C, +55°C, +75°C und +95°C und zwei Wasserbäder mit 75%igem Äthylenglykolanteil mit +115°C und +135°C verwendete. Er fand, daß auf eine Erhöhung der Auftautemperatur bis +95°C eine jeweils signifikante Verbesserung der Spermaqualität erfolgte, die aber durch eine weitere Anhebung der Auftautemperaturen auf +115°C und +135°C keine signifikante Steigerung erfuhr.

ALMQUIST und WIGGIN (1973a, 1973b) überprüften die Interaktion von Einfrier- und Auftaurate auf die Motilität von Pailletten-samen. Schnelles Auftauen im Wasserbad von +75°C und +95°C er-brachte unabhängig von der Einfrierrate signifikant bessere Er-gebnisse, als langsames Auftauen im Wasserbad von +35°C und im Eiswasserbad.

ROBBINS et al. (1976) und GILBERT und ALMQUIST (1978) bestätigten diese Beobachtungen sowohl für die Motilität als auch für die Akrosomintegrität.

ROBBINS et al. (1976) fanden eine Interaktion zwischen Glycerin-gehalt und Auftaurate. Ihre Ergebnisse zeigen, daß ein Ansteigen des Glyceringehaltes von 4,5 % - 8,5 % eine Erhöhung der Auftau-rate nach sich ziehen muß, um minimale Spermienschäden in bezug auf Motilität und Akrosomintegrität zu erreichen. So ermittelten WIGGIN und ALMQUIST (1975) für milchverdünnten Paillettensamen als optimale Kombination einen Glyceringehalt von 10,7 % und eine Auftautemperatur von +75°C.

PAGE et al. (1981) überprüften den Einfluß dreier verschiedener Auftaumethoden in Labor- und Feldversuchen in bezug auf die Motilität, Akrosomintegrität und Befruchtungsfähigkeit von in französischen Pailletten abgepacktem TGN₂-Bullensamen. Alle Spermienparameter zeigten bei der Auftaumethode mit der höchsten Wasserbadtemperatur von +37°C signifikant bessere Resultate als bei +1°C und +10°C, was auch zu einem größeren Befruchtungserfolg führte.

SENGER et al. (1976) untersuchten die Auswirkungen zweier Auftaumethoden (+35°C/1 Min. und +5°C/3 Min.) mit gleichen Nachauftaumanipulationen (Lagerung im Wasserbad von +1°C, +20°C und +37°C für jeweils 1 oder 3 Minuten) auf die Motilität und Akrosomintegrität. Die Auswertung erfolgte sofort und nach einer 4- bis 8-stündigen Inkubation bei +37°C. Die Expositionszeit von 1 oder 3 Minuten bewirkte keine Unterschiede. Die bei +35°C/1 Min. und +20°C beziehungsweise +37°C "nachbehandelten" Proben hatten hinsichtlich Motilität und Akrosomintegrität bessere Ergebnisse als alle anderen Proben, die bei +5°C/3 Min. aufgetaut wurden. Kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Auftaumethoden fand sich bei der Nachbehandlung im Wasserbad von +1°C. Für die +5°C/3 Min. aufgetauten Proben zeigte sich ein signifikant höheres Vorkommen von akrosomalen Schäden, wenn der Samen sofort nach dem Auftauen auf +20°C und +37°C erwärmt wurde.

ALMQUIST (1976b) überprüfte zwei Kälteschockbehandlungen (+5°C für 10 und 20 Sek.) nach unterschiedlichen Auftaumethoden

(+5°C/20 Sek., +5°C/50 Sek., +35°C/10 Sek., +35°C/20 Sek., +35°C/80 Sek.) und untersuchte die Spermienparameter Motilität und Akrosomintegrität. Bei der Auftaumethode +35°C/10 Sek. stellte er keine schädigenden Auswirkungen auf die Spermienparameter fest, wenn die Samenendtemperatur nach dem Auftauen +5°C nicht überschritt. Bei Auftaumethoden mit Endtemperaturen über +5°C nach dem Auftauen konnte er einen schädigenden Einfluß feststellen, der sich stärker bei der Akrosomintegrität als bei der Motilität auswirkte. Es zeigte sich aber, daß die verlängerte Auftauzeit zu einer Verbesserung der Spermaqualität führte. Nur nach einer extremen Abkühlung von +5°C/30 Sek. lagen die Werte für die Akrosomintegrität bei der Auftaumethode +35°C/80 Sek. unter denen der Auftaumethode von +35°C/10 Sek.

Aus den Ergebnissen von SENGGER et al. (1976) und ALMQUIST (1976b) läßt sich ableiten, daß die extreme Abkühlung von Samen, der durch entsprechende Auftaumethoden auf Körpertemperatur gebracht worden ist, durch Eintauchen in ein Wasserbad von +1°C bzw. +5°C zu starken Samenschädigungen führt. Um dieses Risiko zu vermeiden, empfahlen sie daher für die Besamungspraxis, den Auftauvorgang so zu wählen, daß die Temperatur des Samens +5°C unmittelbar nach dem Auftauen nicht überschreitet, um extreme Abkühlungen ("Kälteschock") durch kalte Besamungsgeräte oder Umgebungstemperatur zu vermeiden.

Neben diesen Gefahrenquellen haben SENGGER et al. (1976) erstmals auf den schädigenden Einfluß einer weiteren Erwärmung des Samens über die Auftautemperatur von +5°C hinaus hingewiesen.

DE ABREU et al. (1979) untersuchten daher diesen neuen Aspekt der Schädigung des Samens durch die Erwärmung im Temperaturbereich zwischen $+5^{\circ}\text{C}$ bis Körpertemperatur. Sie konnten belegen, daß die Nacherwärmung für den aufgetauten Samen schädlich ist, unabhängig von der Auftau- sowie der Nacherwärmungsrate und, ob sie sofort oder nach einer Verzögerung erfolgte.

BROWN et al. (1982) überprüften daher erneut den Einfluß der beiden Faktoren Abkühlung und Nacherwärmung (Abb. 1). Samen, der bei $+35^{\circ}\text{C}/12$ Sek. aufgetaut wurde, so daß er lediglich eine Temperatur von -4°C erreichte und anschließend für 1 Minute bei 0°C gehalten wurde, bevor die endgültige Erwärmung auf $+40^{\circ}\text{C}$ erfolgte,

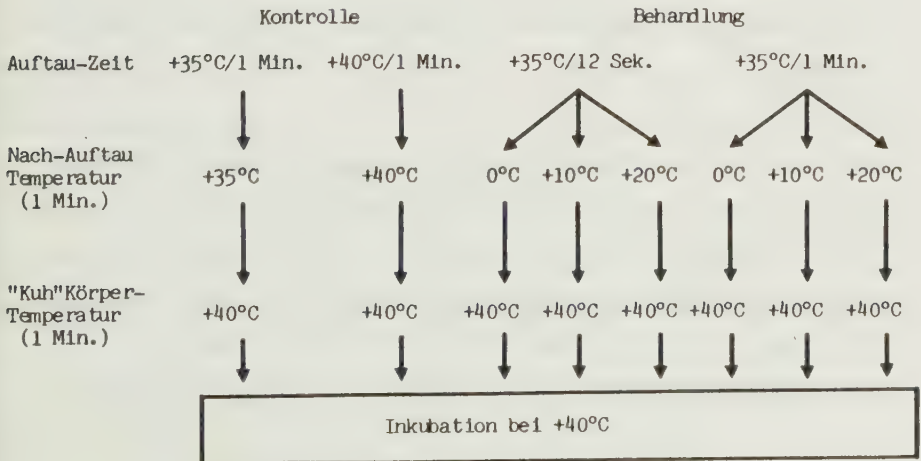


Abb. 1: Versuchsdiagramm der Auftau- und Nachauftau-Behandlungen von TGN_2 -Bullensperma (BROWN et al. 1982)

zeigte auf Grund der Verzögerung des vollständigen Auftauens Akrosomschäden. Samen, der infolge einer längeren Auftauzeit ($+35^{\circ}\text{C}/1 \text{ Min.}$) eine Temperatur von $+35^{\circ}\text{C}$ erreichte, bevor er bei 0°C gelagert und im Anschluß daran auf $+40^{\circ}\text{C}$ erwärmt wurde, wies dagegen auf Grund der raschen Abkühlung nach dem Auftauen und der erneuten Erwärmung auf $+40^{\circ}\text{C}$ ein höheres Maß an Akrosomschäden auf. Der Schaden durch die extreme Abkühlrate im Temperaturbereich zwischen $+35^{\circ}\text{C}$ und 0°C ("Kälteschock") war also größer als der, der durch die Verzögerung des vollständigen Auftauens verursacht wurde. Bei der Nachauftautemperatur zeigte sich dagegen nur eine latente Schädigung, die erst nach einer 4- bis 8-stündigen Inkubation beobachtet werden konnte, wogegen bei $+20^{\circ}\text{C}$ keine Differenzen mehr zu den Kontrollwerten vorhanden waren. Für die Besamungspraxis empfahlen sie die verlängerte Auftauzeit mit der Auflage, den Samen geschützt bis zur Insemination aufzubewahren, wodurch extreme Abkühlungen ("Kälteschock") leicht vermieden werden können.

Diese Empfehlung wird auch durch die Beobachtungen von NEBEL et al. (1979) und CHANDLER et al. (1984) gestützt.

NEBEL et al. (1979) untersuchten den Effekt von Auftautemperatur und Auftauzeit und stellten fest, daß ein direkt auf $+35^{\circ}\text{C}$ bis $+36^{\circ}\text{C}$ aufgetauter Samen die geringsten Akrosomschäden aufweist.

CHANDLER et al. (1984) erhielten die besten Ergebnisse in bezug auf die Akrosomkappen, wenn sie Continental Pailletten (0,3 ml) bei +44°C 29 Sekunden bzw. französische mittlere Pailletten bei +40°C 20 Sekunden lang auftauten. Die Resultate waren unabhängig von der Verarbeitungsform.

Zur Überprüfung der Laborversuche wurden bisher zahlreiche Besamungsversuche unternommen (Tab. 1). Es zeigte sich, daß die Auftaumethoden mit verlängerter Auftauzeit den anderen Methoden grundsätzlich überlegen sind. Dies scheint unabhängig davon zu sein, ob zusätzliche Schutzmaßnahmen vor einer Abkühlung des aufgetauten Samens getroffen werden, wie sie z.B. von ALMQUIST et al. 1979, 1982) empfohlen wurden, oder nicht.

KUPFERSCHMIED und GAILLARD (1981), die keine gesonderten Schutzmaßnahmen anwendeten, fanden auch in den Wintermonaten bessere Befruchtungsergebnisse nach verlängerter Auftauzeit. Diese und andere Feldversuche (siehe Tab. 1) lassen den Schluß zu, daß das Risiko einer Schädigung des auf Körpertemperatur erwärmten Spermias durch eine rasche Abkühlung, wie sie unter experimentellen Bedingungen erzeugt werden kann ("Kälteschock"), unter den Verhältnissen der routinemäßigen künstlichen Besamung sehr gering ist.

Tab. 1: Besamungsergebnisse nach verschiedenen Auftauzeiten. Chronologische Zusammenfassung von Literaturangaben (nach KUPFERSCHMID und GAILLARD 1981; ergänzt mit ALMQUIST et al. 1982)

Abpackung	Auftautemperatur(°C)	Auftauzeit	Erstbesamungen(n)	Besamungsergebnis (%)	Differenz	Autoren
0,5	0 +35 +35	nicht beschränkt 30 Sek. - 10 Min. 12 bis 15 Sek.	6173 6773 7437	55,81 NRR60-90 Tage 62,91 61,83	sign. zwischen 0 & +35°	FORDE und GRAVIER 1973
0,25	+35 +35	7 Sek. 21 Sek.	2084 1932	68,62 NRR60-90 Tage 71,17	n. sign.	JONDET und RABADEUX 1977
0,3	+32 bis +35 +32 bis +35	12 Sek. 30 Sek.	10682 10742	70,1 NRR 66 Tage 72,0	sign. (P ≤ 0,01)	ALMQUIST et al. 1979
0,3	+35 +40	15 Sek. 30 Sek.	1627 1658	61,9 NRR60-90 Tage 66,4	sign. (P ≤ 0,08)	CHANDLER et al. 1980
0,25	+35	21 Sek. 50 bis 75 Min.	37447 575	64,31 NRR60-90 Tage 65,56	n. sign.	JONDET und RABADEUX 1980
0,5	+35 +35	12 Sek. 30 Sek.	110 108	55,6 T 69,0	n. sign.	BERNDSTON und PICKETT 1981
0,25	+38 +38	8 Sek. 25 Sek.	43929 43559	69,25 NRR120 Tage 69,70	sign. (P ≤ 0,16)	KUPFERSCHMID und GAILLARD 1981
0,5	+32 bis +35	9 Sek. 40 Sek.	9064 8993	64,4 66,3	sign. (P ≤ 0,05)	ALMQUIST et al. 1982

0,5 = französische Pailletten zu 0,5 ml
0,25 = französische Pailletten zu 0,25 ml
0,3 = Continental straws (USA) zu 0,3 ml

NRR = Non-Return-Rate
T = Trächtigkeitsrate

2.4. Temperaturwechsel bei der Handhabung von TGN₂-Bullensperma im Container und sein Einfluß auf die Spermaqualität

Das Einfrieren und Aufbewahren von Bullensperma im flüssigen Stickstoff bei -196°C stellt heute eine Standardmethode dar, die es erlaubt, den TGN₂-Samen ohne Verlust an Lebens- und Befruchtungsfähigkeit lange Zeit zu konservieren. Wird der TGN₂-Samen jedoch wiederholten Temperaturwechseln ausgesetzt, so führt dies zu Umkristallisationsvorgängen und in der Folge zu mechanischer Samenzellschädigung (MERKT et al. 1971). Sogar bei -100°C findet noch die sogenannte migratorische Rekristallisation statt, die allerdings zwischen -60°C und -10°C am größten ist (LUYET 1957). GREAVES et al. (1963) wiesen darauf hin, daß thermodynamische Veränderungen noch bei Temperaturen bis -130°C auftreten können.

Eine Schädigung der Spermastruktur durch Temperaturwechsel konnte BADER (1971) experimentell nachweisen. Er setzte hierzu TGN₂-Bullensperma verschiedenen Temperaturen zwischen -80°C und -20°C aus und senkte anschließend die Temperatur wieder auf -196°C ab. BADER stellte dabei fest, daß sich der Anteil morphologisch geschädigter Spermien (bei gleichzeitiger Verringerung der Auftau-rate) in Relation zur Erwärmung bis auf das Vierfache der ursprünglichen Werte erhöht.

PILCH (1980) untersuchte den Einfluß von Temperaturen zwischen -12°C bis -80°C auf die Motilität von Bullensamen nach dem Auftauen, um den kritischen Temperaturbereich zu bestimmen. Für

Paillettensamen erstreckt sich der Bereich, in dem die größten Veränderungen an den Spermien auftreten, von -12°C bis -30°C beim Einfrieren bzw. zwischen -12°C und -45°C beim Auftauen.

Im Verlauf der TGN_2 -Samenlagerung kann es bei unsachgemäßer Handhabung zu einer unbeabsichtigten Temperaturerhöhung des TGN_2 -Samens kommen, z.B. bei der Umlagerung des Samens von Container zu Container, bei zu weitem Herausziehen der Kanister aus dem Container oder bei zu geringem N_2 -Gehalt des Containers.

So ermittelte HAHN (1968), der fünf Containermodelle testete, daß eine Temperatursteigerung in den Samenportionen (Ampullen) auch bei voller Füllung des Behälters mit Stickstoff nicht zu verhindern ist, wenn der Kanisterstiel mehr als 10 cm über den Containerhals angehoben wird. Wurde der obere Kanisterhals mit dem Containerhals auf gleiche Höhe gebracht, d.h. der gesamte Kanisterstiel herausgezogen, kann es in den Ampullen sogar zu einer Temperaturerhöhung auf -50°C bis -60°C kommen. Eine Temperatur, bei der der Samen innerhalb von 3 - 4 Tagen abstirbt.

ARBEITER (1977) zeigte weitere Gefahrenquellen bei der Handhabung von TGN_2 -Bullensamen in Pailletten auf. Er fand, daß das Risiko der Temperaturerhöhung bei bestimmten Manipulationen in perforierten Kanistern wesentlich höher ist als in nicht perforierten. Mit abnehmender Paillettenzahl im Kanister war bei gleicher Manipulation eine höhere Temperaturdifferenz verbunden. Bei einem Anheben des Kanisters über den Containerhals wurden größtenteils

Werte über -120°C (aber nur mit perforiertem Kanister) erreicht. Die N_2 -Füllung des Containers hatte dagegen keinen entscheidenden Einfluß auf den Verlauf der Temperaturkurven. Die Equilibrierungszeit (die Temperaturangleichung nach Reposition der Paillette im Lagerbehälter) aber war in hohem Maße mit dem Füllungsgrad korreliert. Im Extremfall konnte sie bei Viertelfüllung bis zu 15 Minuten beanspruchen. In einem Feldversuch konnte er weiter zeigen, daß während der Sommermonate durch die häufigere Manipulation und wahrscheinlich höhere Umgebungstemperatur eine signifikante Minderung der Spermaqualität gegenüber den Wintermonaten auftrat.

2.5. Elektrowärme mit Mikrowellen

Unter Mikrowellen versteht man elektromagnetische Wellen mit Frequenzen zwischen 10^8 und 10^{12} Hz mit den entsprechenden Wellenlängen zwischen 300 cm und 0,03 cm. Sie werden von einem Hochfrequenzgenerator (Magnetron oder Klystron) erzeugt. In handelsüblichen Mikrowellenherden arbeiten sie z.B. mit einer Frequenz von 2450 MHz (Megahertz).

Für Mikrowellen gelten die bekannten Gesetzmäßigkeiten für Beugung, Brechung, Interferenz, Polarisation und Reflexion (DORN und BADER 1976). Sie können je nach Material reflektiert werden, Substanzen durchdringen oder absorbiert werden.

Treffen Mikrowellen auf Metalle wie Stahl, Aluminium oder Kupfer, so werden sie an die Oberfläche zurückgeworfen. Die Reflexion beruht auf der elektrischen Leitfähigkeit dieser Stoffe. Elektrisch isolierende Stoffe, wie Porzellan, Glas, Steingut, Keramik, Pappe oder Kunststoff durchdringen sie, ohne sie direkt zu erwärmen. Organische Stoffe, wie z.B. Lebensmittel, absorbieren die Energie des Mikrowellenfeldes (RUMM-KREUTER 1983). Dadurch erhöht sich die mittlere kinetische Energie der Moleküle eines Stoffes, was nach der allgemeinen Wärmetheorie äquivalent mit einer Temperaturerhöhung ist. Dies bedeutet, daß die Wärme durch Mikrowellenenergie direkt in der organischen Materie erzeugt wird. Die Intensität der Wärmeentwicklung hängt unter anderem von der Stärke des Mikrowellenfeldes, der Zusammensetzung des organischen Materials und der Eindringtiefe ab (VOSS 1974).

Die Anwendungsgebiete der Elektrowärme durch Mikrowellen sind weit gestreut. In der Medizin wird sie erfolgreich zur gezielten Erwärmung von menschlichem und tierischem Gewebe eingesetzt (Hyperthermie, Diathermie). Die Nahrungsmittelindustrie benützt sie zur Pasteurisierung und Sterilisierung von Speisen (NIMTZ 1980) und immer mehr dienen Mikrowellen im Haushalt zum Auftauen und Erwärmen von Lebensmitteln (RUMM-KREUTER 1983).

Es ist naheliegend, dieses Verfahren auf das Auftauen von TGN₂-Sperma zu übertragen.

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1. Material und Methoden

3.1.1. Herkunft des Samens

Für die Versuche stand tiefgefrorener Samen in Pailletten (Fa. Cassou, Fassungsvermögen 0,5 ml) aus 42 Ejakulaten zur Verfügung. Das Sperma stammte von 42 Altbullen der Deutschen Fleckviehrasse des Besamungsvereins Neustadt/A. Das Alter der Bullen lag zwischen 5 und 10 Jahren.

Alle verwendeten Samenproben waren nach dem Routineverfahren des Besamungsvereins Neustadt/A. mit dem Eigelb-Tris-Verdüner auf eine Glycerinendkonzentration von 6 % verdünnt und nach einer Anpassung im Stickstoffdampf weiter auf -196°C tiefgefroren worden. Die Lagerungsdauer im flüssigen Stickstoff betrug 3 Monate bis 4 Jahre. Die Verarbeitung und die Qualitätskontrollen des TGN₂-Samens wurden in sogenannten "Spermaprotokollen" festgehalten.

Für die Versuche wurden nur Samenportionen von Ejakulaten verwendet, die nach der üblichen Qualitätskontrolle (lichtmikroskopische Beurteilung der Motilität) für die routinemäßige Besamung freigegeben worden wären, d.h., daß sie eine geschätzte Vorwärtsbeweglichkeit von mindestens 50 % besaßen.

3.1.2. Dichtebestimmung

Die Dichtebestimmung erfolgte mit der Zählkammer nach BÜRKER.

3.1.3. Bestimmung der Motilität

Auf einen vorgewärmten Objektträger (26 x 76 x 1 mm) wurden jeweils zwei kleine Tropfen (ca. 0,01 ml) des aufgetauten Samens im Abstand von 4 cm aufgebracht und mit einem Deckglas (18 x 18 mm) abgedeckt. Mittels eines Phasenkontrastmikroskopes (Okular 10-fach x Objektiv 12,5-fach; Leitz Wetzlar), mit automatischem Heiztisch (+38°C) und angeschlossener Videokamera (TV Camera ITC, CTC 6000 von Ericcson) mit Monitor und Aufzeichnungsgerät (Video-recorder TVR-321/E von Ericcson), wurden die vorwärts-, orts- und unbeweglichen Spermien geschätzt.

Die Schätzung erfolgte erstens durch den Versuchsansteller selbst, der die Untersuchung auf Videoband festhielt, durch einen zweiten, unabhängigen Untersucher, unmittelbar nach der ersten Untersuchung am Mikroskop und drittens durch einen weiteren unabhängigen Untersucher zu einem späteren Zeitpunkt vom Videoband. Es wurden von jedem Präparat 5 Blickfelder, also insgesamt 10, durchgemustert.

Für die weiteren Berechnungen wurden die Mittelwerte verwendet.

3.1.4. Beurteilung der Akrosommorphologie

Die morphologische Beurteilung der Akrosomen erfolgte nach der Methode von HANCOCK (1952), modifiziert nach DOTT und FORSTER (1975), an unfixierten und ungefärbten Spermien. Zur Immobilisierung wurden 3 Tropfen Sperma in 0,4 ml Formolzitratlösung gebracht und in Anlehnung an SAACKE (1970) und PAPA (1982) 200 Spermien beurteilt. Die Untersuchung wurde mit einem Phasenkontrastmikroskop (Okular 10-fach x Objektiv Ph 100-fach) vorgenommen. Die Klassifizierung der Akrosomen folgte der von PAPA (1982) benutzten Nomenklatur:

NAR = Normaler Apikaler Rand

GAR = Geschwollener Apikaler Rand

AIA = Akrosom in Ablösung

AA = Abgelöstes Akrosom

3.1.5. Adenosinnucleotidmessung mit dem Biolumineszenzverfahren

Zur ATP-, ADP und AMP-Bestimmung im Sperma wurde die von KÄHN (1981a, 1981b) erarbeitete Biolumineszenzmethode, die bereits von VELEZ CUEVAS (1982) und BERGER (1983) in ihren Arbeiten angewendet wurde, herangezogen.

Da das Originallösungsmittel des Enzyms Myokinase der Fa. Boehringer Mannheim, ebenso wie bei BERGER (1983), die Biolumineszenz störte, wurde es vor Gebrauch mit 2600g 30 Minuten zentrifu-

giert und das Sediment in Tris- H_2SO_4 -Puffer resuspendiert.

Die verwendeten Meßreagenzien entsprechen den in der Arbeit von BERGER (1983) beschriebenen Chemikalien. Alle Adenosinnucleotidwerte sind, entsprechend dem üblichen Verfahren, in der Einheit $10^{-9} \text{ Mol}/10^8$ Spermien angegeben.

3.1.6. Thermoresistenztest

Zur Überprüfung der Überlebensdauer der Samenzellen "in vitro" wurden die Spermaproben nach dem Auftauen einer 5-stündigen Inkubation im Wasserbad von $+38,5^\circ\text{C}$ unterzogen. Nach dieser Zeit wurde die zweite Beurteilung der Motilität, des Adenosinnucleotidgehaltes und des Prozentsatzes intakter Akrosomen (nur bei einigen Versuchen) vorgenommen.

3.1.7. Temperaturmessung im Inneren der Paillette mit einem Thermoelement

Neben der Messung der Spermienparameter wurde bei allen Versuchen der Temperaturverlauf während des Auftauens und bei den Behandlungen nach dem Auftauen miterfaßt. Er sollte zum einen als Interpretationshilfe für die Ergebnisse der Spermaqualität dienen und zum anderen schädigende Temperatureinflüsse aufdecken.

Zur Messung wurde ein Thermoelement von 0,2 mm Durchmesser in die Mitte einer aufgetauten mittleren französischen Paillette (0,5 ml) eingesetzt. Die Paillette wurde dann mit einem geflochtenen Baumwollstopfen wieder verschlossen. Das Einfrieren erfolgte im Stickstoffdampf für ca. 10 Minuten mit nachfolgendem Eintauchen in den flüssigen Stickstoff. Die Temperaturveränderungen wurden mit Hilfe eines Linienschreibers (Minicomp VL./144) verbunden mit dem CMR-Meßumformer (TEU 310) und dem Thermoelement aus Fe-CuNi für Temperatur- und Gleichstromgrößen (Firma Hartmann und Braun AG) registriert.

3.1.8. Einfluß unterschiedlicher Auftauverfahren auf die Spermaqualität

In den folgenden Versuchen wurden insgesamt fünf Auftaumethoden überprüft. Bei dreien diente ein Wasserbad als Auftaumedium, wobei die Auftautemperatur und -zeit variiert wurde. Die beiden anderen basierten dagegen auf einem erwärmten Metallblock mit Luft als Wärmeüberträger und auf der Elektrowärme mit Mikrowellen. Als Spermienparameter wurden bei allen Versuchen die Motilität und der Adenosinnucleotidgehalt erfaßt und bei zwei Auftaumethoden noch durch den Prozentsatz intakter Akrosome ergänzt. Weiterhin wurde noch jeweils der Temperaturverlauf aufgezeichnet.

3.1.8.1. Sperma

Das Sperma für diesen Auftauversuch stammte von je einem Einzel-ejakulat von 36 Bullen. Es wurden jeweils 2 Pailletten eines Ejakulates gepoolt. Insgesamt wurden in den 5 Versuchsreihen somit 360 Pailletten verwendet.

3.1.8.2. Auftauen im Wasserbad

Folgende drei Auftauverfahren wurden überprüft:

- a) +75°C/9 Sekunden in einem thermostatgesteuerten Wasserbad ;
Zeitnahme mit Stoppuhr
- b) +40°C/30 Sekunden unter Anwendung eines elektronisch gesteuerten Auftaugerätes (MTA 70 der Fa. Minitüb, Landshut)
- c) +35°C/13 Sekunden ebenfalls in dem Auftaugerät MTA 70 mit nachfolgendem Eintauchen in Eiswasser für eine Minute.

Im Anschluß daran wurden die Samenproben in ein Wasserbad von +38,5°C eingetaucht. Zehn Minuten nach Auftaubeginn erfolgte die erste Beurteilung der Spermaqualität und die zweite nach dem Thermoresistenztest. Bei der Auftaumethode +75°C/9 Sekunden wurde außer der Motilität und dem Nucleotidgehalt noch der Prozentsatz intakter Akrosomen ausgewertet.

3.1.8.3. Auftauen mit dem Spermatherm nach Dr. Schille

Der Spermatherm (Fa. Großmann und Söhne OHG, 8620 Lichtenfels) ist ein von SCHILLE (1977) entwickeltes, transportables Trockenauftaugerät. Es besteht aus einem erwärmten Metallblock mit vier eingebohrten Köchern, in die sowohl die Pailletten zum Auftauen, als auch das Besamungsgerät zum Anwärmen verbracht werden. Das Gerät wird zwischen den Besamungen an die Stromversorgung des PKW's angeschlossen, dort aufgeheizt und kann dann beladen mit Paillette und Besamungsgerät in den Stall mitgenommen werden. Die Temperaturkonstanz nach Abnahme des Gerätes von der Stromversorgung ist für ca. 10 Minuten gegeben.

Der Auftauvorgang im Versuch wurde wie folgt durchgeführt: Die Pailletten wurden dem Container entnommen und sofort in einen Köcher des Spermatherns ($+38^{\circ}\text{C}$) mit einem Lift versenkt. Nach 3 Minuten wurde der Samen in ein Wasserbad von $+38,5^{\circ}\text{C}$ verbracht. Die erste Beurteilung der Motilität sowie der Adenosinnucleotide erfolgte zehn Minuten nach Auftaubeginn, die zweite nach dem Thermoresistenztest.

3.1.8.4. Auftauen mit Mikrowellen, ein "Screening-Test"

In der Besamungspraxis hat sich gezeigt, daß Wasserbadtemperaturen über $+40^{\circ}\text{C}$ nicht praktikabel sind. Auf der anderen Seite verbessert aber schnelles Auftauen bei solchen Temperaturen die

Spermaqualität. Aus dieser Problematik heraus sollte die Elektrowärme mit Mikrowellen als Alternative zum Auftauen im Wasserbad überprüft werden.

Da in der Literatur bisher keine Auftauversuche von Tiefgefriersperma mit der Mikrowellenenergie beschrieben sind und demzufolge noch kein speziell für das Auftauen von Pailletten eingerichtetes Mikrowellengerät vorhanden war, diente der Mikrowellenherd "Meisterkoch electronic HF 0030" der Firma Siemens als Auftaugerät. Er besitzt zwei Hochfrequenzleistungsstufen von 240 W und 600 W. Auf Grund des physikalisch-technisch bedingten, uneinheitlichen Mikrowellenenergiefeldes im Herdraum war es erforderlich, in Versuchen sowohl die zu wählende Energiestufe (240 W oder 600 W) als auch die Position der Pailletten im Herdraum zu ermitteln. Das Ziel war, ein möglichst gleichmäßiges Auftauen des Pailletteninhaltes zu gewährleisten. Es zeigte sich, daß dies nur mit der niederen Energiestufe (240 W) erreicht werden konnte. Die Fixation der Pailletten in ihrer vorbestimmten Position erfolgte mit Hilfe von Styroportteilen mit vorgebohrten Löchern zu ihrer Aufnahme.

Der Auftauprozess wurde wie folgt durchgeführt: Die tiefgefrorenen Pailletten wurden dem Container entnommen und in ihre vorbestimmte Position im Mikrowellenherdraum gebracht. Unter Sichtkontakt durch die Glasscheibe der Herdtür wurde der Auftauvorgang kontrolliert. Als Ende des Auftauprozesses wurde der Zeitpunkt gewählt, bei dem der Reif am Außenmantel der Paillette restlos

abgetaut war, was nach 35 - 40 Sekunden der Fall war. Die Paillettentemperatur, die mit einem Thermoelement ermittelt wurde, schwankte dann zwischen +25°C und +40°C. Im Anschluß daran wurden die Samenproben in ein Wasserbad von +38,5°C eingetaucht. Zehn Minuten nach dem Auftaubeginn erfolgte die erste Beurteilung der Spermaparameter Motilität, Adenosinnucleotidgehalt und Prozentsatz intakter Akrosomen und die zweite nach dem Thermoresistenztest.

3.1.9. Einfluß unterschiedlicher Auftauverfahren mit nachfolgenden Manipulationen auf die Spermaqualität

In der Besamungspraxis kann der Tiefgefriersamen vom Auftauen bis zur Insemination starken Temperaturveränderungen, bedingt durch die wechselnden Umweltbedingungen und den jeweiligen Aufbewahrungsort der Paillette durch den Besamer, ausgesetzt sein. In der Literatur finden sich bisher nur Untersuchungen über Nachauftaubehandlungen, die auf dem Eintauchen der Pailletten in verschiedenen temperierte Wasserbäder beruhen. Deshalb wurden 2 Versuche (siehe 3.1.9.2.) angesetzt, die sich an Handhabungen, wie sie in der Besamungspraxis vorkommen, orientierten. Als Parameter für die Auswirkungen dieser Manipulationen werden wieder die Motilität und der Adenosinnucleotidgehalt herangezogen. Weiterhin wurde noch der Temperaturverlauf aufgezeichnet.

3.1.9.1. Sperma

Pro Versuch wurden 36 Proben aus je einem Einzelejakulat von 36 Bullen verwendet. Für jede Probe wurden 2 Pailletten gepoolt. Insgesamt wurden also 144 Pailletten untersucht.

3.1.9.2. Versuchsaufbau

Der erste von beiden Versuchen wurde im Kühlraum bei $+5^{\circ}\text{C}$ ausgeführt und ist durch folgende Schritte charakterisiert: Nach dem Auftauen im Wasserbad von $+40^{\circ}\text{C}$ und einer Auftauzeit von 30 Sekunden, wurde die Paillette, ohne abzutrocknen, der Umgebungstemperatur ($+5^{\circ}\text{C}$) für eine Minute ausgesetzt und dann in die Brusttasche des Untersuchers (ca. $+30^{\circ}\text{C}$) für weitere drei Minuten gesteckt. Danach wurde sie in eine Cassoupistole ($+5^{\circ}\text{C}$) eingeführt und eine Minute später, zusammen mit dem Besamungsgerät, in ein Wasserbad von $+38,5^{\circ}\text{C}$ eingetaucht. Die erste Beurteilung der Spermienparameter erfolgte 10 Minuten nach Auftaubeginn, die zweite nach dem Thermoresistenztest.

Der zweite Versuch wurde im Laborraum bei ca. $+20^{\circ}\text{C}$ durchgeführt. Nach dem Auftauen im Wasserbad von $+20^{\circ}\text{C}$ und einer Auftauzeit von 20 Sekunden, wiederholten sich dieselben Schritte wie im ersten Versuch, mit dem Unterschied, daß die Umgebungstemperatur (und auch die in der Cassoupistole) $+20^{\circ}\text{C}$ betrug, so daß letztendlich eine progressive Erwärmung auf Körpertemperatur erreicht wurde.

3.1.10. Einfluß unterschiedlicher Auftauverfahren mit demselben Belastungstest nach dem Auftauen auf die Spermaqualität

Umfangreiche Besamungsversuche der letzten Jahre haben gezeigt, daß die Auftaumethoden, bei denen die Endtemperaturen nahe bei der Körpertemperatur liegen, zu den besten Befruchtungsergebnissen führen und zwar sowohl in den Sommer-, als auch in den Wintermonaten. Dies widerspricht der lange Zeit gängigen Empfehlung, den Tiefgefriersamen nur bis $+5^{\circ}\text{C}$ zu erwärmen, um so die Spermaschädigungen durch Abkühlung nach Erreichen der Körpertemperatur zu vermeiden. Beim folgenden Versuch wurden 3 Auftaumethoden gewählt, die sich vor allem in der Samenendtemperatur nach der Entnahme aus dem Auftauwasser unterscheiden. Ein nachfolgender, an der Praxis orientierter Belastungstest, sollte die Frage klären, ob bei höheren Samenendtemperaturen die Spermienparameter Motilität, Adenosinnucleotidgehalt und Prozentsatz intakter Akrosome empfindlicher reagieren, als bei niedrigen Endtemperaturen.

3.1.10.1. Sperma

In jedem der drei Versuche (siehe 3.1.10.2.) wurden 10 Proben (jeweils aus 2 Pailletten gepoolt) eingesetzt. Die Proben stammten aus 10 Einzelejakulaten von 10 Bullen. Insgesamt wurden 60 Pailletten untersucht.

3.1.10.2. Versuchsaufbau

Für die drei Auftaumethoden $+35^{\circ}\text{C}/13$ Sekunden, $+35^{\circ}\text{C}/20$ Sekunden und $+40^{\circ}\text{C}/30$ Sekunden wurde das elektronisch gesteuerte Wasserbadauftaengerät MTA 70 der Firma Minitüb, Landshut, verwendet. Der Belastungstest selbst war durch folgende Schritte charakterisiert: Nach der Entnahme aus dem Wasserbad wurden die Pailletten abgetrocknet und für die Dauer von 3 Minuten in die Brusttasche des Untersuchers (ca. $+29^{\circ}\text{C}$) gesteckt. Daraufhin erfolgte eine Abkühlung, indem sie für eine Minute in ein Wasserbad von $+10^{\circ}\text{C}$ eingetaucht und abschließend wieder in einem Wasserbad von $+38,5^{\circ}\text{C}$ erwärmt wurden. Die erste Beurteilung der Spermienqualität erfolgte 10 Minuten nach Auftaubeginn und die zweite nach dem Thermo-resistenztest. Der Temperaturverlauf wurde jeweils aufgezeichnet.

3.1.11. Einfluß von Temperaturen unter dem Nullpunkt auf die Spermaqualität

HAHN (1968) fand bei seinen Untersuchungen, daß ein zu weites Herausziehen des Kanisters aus dem N_2 -Container, unabhängig vom N_2 -Gehalt im Container, zu einer Erwärmung in die kritischen Bereiche für TGN₂-Samen von über -120°C führt. Es sollte daher überprüft werden, ob sich derartige Temperatureinflüsse auf die Spermienparameter Motilität und Adenosinnucleotidgehalt auswirken.

Die Versuchsanordnung ist in Abbildung 2 dargestellt. Die tiefgefrorenen Pailletten wurden dem N_2 -Container entnommen und sofort in ein Methylalkoholbad mit unterschiedlichen Temperaturstufen (-5°C , -10°C , -20°C , -40°C , -60°C) eingetaucht. Die Temperaturen des Methylalkoholbades wurden durch Einleitung von flüssigem Stickstoff erzeugt. Nach der Anpassungszeit an die jeweilige Temperatur folgte eine Inkubation für die Dauer von 1, 10 bzw. 60 Minuten. Die Anpassungszeiten der jeweiligen Temperaturstufe in den Pailletten wurden in Vorversuchen mit dem Thermoelement ermittelt. Sie betrugen für die Temperaturstufen von -5°C bis -60°C ca. 18, 30, 48, 54 und 57 Sekunden.

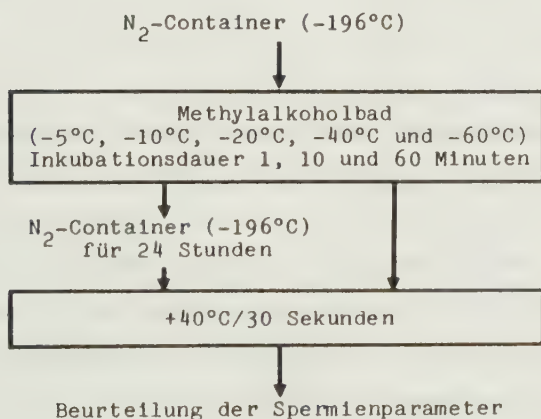


Abb. 2: Versuchsdiagramm der Erwärmung von TGN₂-Bullensperma auf Temperaturen unter dem Nullpunkt

In einer ersten Versuchsreihe wurden dann die Pailletten nach der Inkubationszeit in den N_2 -Container zurückverlagert und nach 24 Stunden bei $+40^\circ C/30$ Sekunden aufgetaut.

In der zweiten Versuchsreihe wurden die Pailletten im Anschluß an das Methyllalkoholbad bei $+40^\circ C/30$ Sekunden sofort aufgetaut.

Die Beurteilung der Spermienqualität erfolgte direkt nach dem Auftauprozeß. Pro Versuchsansatz, d.h. für jede der insgesamt 30 möglichen Kombinationen (siehe Abb. 2) wurden 6 Pailletten verwendet, die aus 3 Ejakulaten von 3 Bullen stammten. Aus technischen Gründen kamen beim Bullen A jeweils 2 Pailletten einzeln zur Untersuchung, während bei den Bullen B und C jeweils 2 Pailletten gepoolt wurden.

3.1.12. Temperaturverlauf im Inneren einer Paillette bei der Handhabung wie in der Besamungspraxis

Mit Hilfe der Temperaturverlaufsmessungen mit dem Thermoelement sollten die kritischen Temperaturen, wie sie bei der Handhabung in der Besamungspraxis unter verschiedenen Bedingungen auftreten können, ermittelt werden.

3.1.12.1. Auftaumethoden

Die tiefgefrorenen Pailletten wurden verschiedenen Auftauprozessen unterzogen, um zu untersuchen, wie lange dabei der Samen den kritischen Temperaturbereichen von -20°C bis 0°C ausgesetzt ist.

Folgende Versuchsanordnungen wurden gewählt:

Auftauen im Leitungswasser ($+13,5^{\circ}\text{C}$): Hierzu wurde zum einen ein Wasserbad verwendet und zum anderen der Wasserstrahl aus dem Leitungshahn, in den die Pailletten hineingehalten wurden.

In der Umgebungstemperatur: Die beiden Versuche erfolgten im Laborraum (ca. $+22,5^{\circ}\text{C}$) und im Kühlraum (ca. $+5^{\circ}\text{C}$).

In der Brusttasche des Untersuchers (ca. $+30^{\circ}\text{C}$): Die Pailletten wurden direkt vom Container in die Brusttasche gesteckt.

In der Faust des Untersuchers: Hier hat es sich gezeigt, daß es nicht möglich ist, bei normaler Handgröße die Paillette gleichmäßig aufzutauen. Das Thermoelement befand sich in dem Teil der Paillette, der von der Hand bedeckt wurde.

Im Spermatherm: Ergänzend zu der Versuchsanordnung im Abschnitt

3.1.8.3. wurde noch eine weitere Auftauvariation überprüft. Der tiefgefrorene Samen wurde hierfür in das auf $+38^{\circ}\text{C}$ im Spermatherm aufgewärmte Cassougerät eingeführt und die Plastikhülle, die ebenfalls $+38^{\circ}\text{C}$ hatte, darübergestülpt. Gemeinsam wurden sie dann zum weiteren Auftauen in den Köcher des Spermatherm gesteckt. Der Temperaturverlauf und das Erreichen der Endtemperaturen wurden mit dem Thermoelement ermittelt und die dazu jeweils benötigte Zeitdauer registriert. Bei allen Verfahren wurden die Samenpor-

tionen so lange den jeweiligen Temperaturen ausgesetzt, bis eine Angleichung erfolgt war.

3.1.12.2. Einfluß der Bewegung der Paillette im Wasserbad auf den Temperaturverlauf

Ohne Bewegung oder Umrühren sinkt die Umgebungstemperatur der tiefgefrorenen Pailletten im Auftauwasserbad ab. In der Gebrauchsanweisung für die Handhabung des tiefgefrorenen Bullensamens an der Besamungsaußenstelle (Neustadt/A.) wird z.B. empfohlen, die Pailletten während des Auftauens im Wasserbad leicht zu bewegen. Der folgende Versuch sollte daher den Einfluß auf den Temperaturverlauf durch die Bewegung der Pailletten während des Auftauprozesses klären.

Es wurden Pailletten in ein Wasserbad von $+35^{\circ}\text{C}$ eingetaucht, und zwar 13 Sekunden lang. In der ersten Versuchsanordnung wurden die Pailletten die ganze Zeitdauer nicht bewegt. In der zweiten wurden sie dagegen ständig in kreisender Bewegung gehalten. Jede Versuchsanordnung wurde 10-mal wiederholt.

3.1.12.3. Einfluß des Abtrocknens der Paillette auf den Temperaturverlauf

Der Versuch umfaßte vier Versuchsanordnungen (siehe Abb. 3), die jeweils fünfmal wiederholt wurden. In den ersten beiden wurden

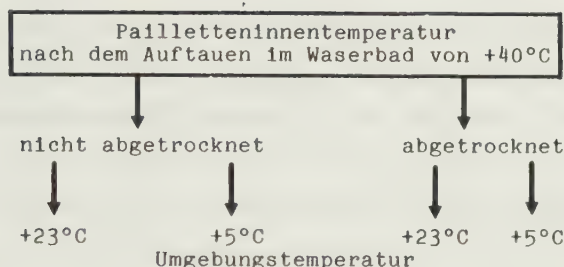


Abb. 3: Versuchsdiagramm zum Einfluß des Abtrocknens und Nicht-Abtrocknens auf den Temperaturverlauf von TGN₂-Bullensperma

die tiefgefrorenen Pailletten, nachdem sie eine Minute in ein Wasserbad von +40°C eingetaucht waren, ohne abzutrocknen einer Umgebungstemperatur von +5°C (Kühlraum) bzw. +23°C (Laborraum) ausgesetzt. Die Behandlungen bei den beiden anderen Versuchsanordnungen unterscheiden sich nur in einem Punkt, und zwar wurden die jeweiligen Pailletten nach der Entnahme aus dem Wasserbad abgetrocknet. Der Temperaturverlauf wurde verfolgt, bis eine Anpassung an die Umgebungstemperatur erreicht war.

3.1.13. Besamungsversuch: Einfluß von zwei verschiedenen Auftaufverfahren auf die Befruchtungsfähigkeit von TGN₂-Bullensperma

Zahlreiche Labor- und Feldversuche haben gezeigt, daß eine verlängerte Auftauzeit, mit den daraus resultierenden Samenendtempe-

raturen nach dem Auftauen bis zur Körpertemperatur, sowohl eine bessere Spermaqualität als auch bessere Befruchtungsergebnisse liefert. Da die Ergebnisse der Besamungsversuche häufig nur eine Tendenz und keine signifikant absicherbaren Differenzen zugunsten der Auftaumethoden mit verlängerten Auftauzeiten zeigen, sollte ein erneuter Versuch in den Wintermonaten zur Klärung dieser Problematik beitragen.

3.1.13.1. Versuchsmaterial

Der TGN₂-Bullensamen stammte aus dem Routinebetrieb des Besamungsvereins Neustadt/A. e.V. Die Zuteilung der Samenportionen an die 32 beteiligten Besamer (13 Besamungstechniker, 9 Fachagrarwirte und 10 Tierärzte) erfolgte gemäß deren routinemäßiger Bestellung. Insgesamt wurden 26112 Erstbesamungen für den Versuch ausgewertet.

3.1.13.2. Versuchsaufbau

Die Samenportionen wurden während der Monate Oktober, November bis Mitte Dezember alternierend mit den Auftaumethoden +40°C/30 Sekunden und +35°C/13 Sekunden aufgetaut. Das Verfahren mußte täglich gewechselt werden. Die Besamungsbeauftragten waren angehalten, die Auftauzeiten durch Stoppuhren zu messen, nur jeweils eine Paillette aufzutauen, die Cassouapistole vor dem Einsatz

durch fünfmaliges Hin- und Herziehen unter der Achsel anzuwärmen und die Paillette bis zum Laden der Pistole in der Hemdbrusttasche aufzubewahren.

Als Befruchtungsparemeter wurde die "60/90 Tage Non-Return-Rate" herangezogen.

3.1.14. Statistische Methoden

Die Auswertung der Untersuchungsergebnisse mit Hilfe der EDV erfolgte im Institut für Tierzucht und Tierhygiene. Für die statistischen Berechnungen wurde das Statistik-Programm-System für die Sozialwissenschaften (SPSS) verwendet (BEUTEL et al. 1980). Im einzelnen wurden der Scheffé-Test, die χ^2 -Analyse, der t-Test sowie die Berechnung der Korrelationskoeffizienten herangezogen.

3.2. Ergebnisse

3.2.1. Einfluß unterschiedlicher Auftauverfahren mit und ohne Variation der Temperaturen nach dem Auftauen auf die Spermaqualität

Die Überprüfung unterschiedlicher Auftautemperaturen und -zeiten im Wasserbad (siehe 3.1.8.2.) sowie das Auftauverfahren mit dem Spermatherm (siehe 3.1.8.3.) erbrachte folgende Ergebnisse (Tab. 2, 3, 4):

Die Auftaumethode +75°C/9 Sekunden zeigt hier bei beiden Beurteilungen (10 bzw. 300 Minuten nach Auftaubeginn) der drei Spermaparameter Motilität, ATP-Gehalt und AEC-Wert die besten Ergebnisse, gefolgt von dem Verfahren +40°C/30 Sekunden (Tab. 2, 3, 4). Die geringen Differenzen zwischen beiden Verfahren sind nicht signifikant. Die +35°C/13 Sekunden bzw. die Auftaumethode mit dem Spermatherm führen zu einer bedeutend niedrigeren Motilität im Vergleich zu der Methode +75°C/9 Sekunden und zwar sowohl bei der Untersuchung 10 Minuten nach Auftaubeginn als auch nach dem Thermoresistenztest (5 Stunden nach Auftaubeginn; $P \leq 0,05$). Hinsichtlich des ATP-Gehaltes bzw. des AEC-Wertes wurden bei der Untersuchung 10 Minuten nach Auftaubeginn bei diesem Verfahren im Vergleich zu der Methode +75°C/9 Sekunden keine signifikanten Differenzen festgestellt, während nach dem Thermoresistenztest in den meisten Fällen eine Verschlechterung eintrat (Tab. 3, 4). Verglichen mit der Methode +40°C/30 Sekunden ist der Motilitäts-

Tab. 2: Einfluß verschiedener Auftaumethoden mit und ohne Variation der Temperatur nach dem Auftauen auf die Vorwärtsbeweglichkeit der Spermien (%) von TGM,-Bullensperma; $\bar{x} \pm s$ von jeweils 36 Proben in mittleren französischen Pailletten (0,5 ml), die aus je einem Einzelejakulat von 36 Bullen stammen. Pro Probe wurden 2 Pailletten je Ejakulat gepoolt.

Untersuchungs- zeitpunkt (Minuten nach Auftau- beginn)	Aufbaumethoden mit und ohne Nachaufbaubehandlungen					
	a) +75°C/9 Sek.	b) +40°C/30 Sek.	c) +35°C/13 Sek. anschließend Eiswasserbad	d) Spermatherm	e) +40°C/30 Sek. mit anschlie- ßender Abküh- lung	f) +20°C/20 Sek. mit anschlie- ßender progres- siver Erwärmung
10	56,6 $\pm$ 5,54	52,7 $\pm$ 6,25	45,8 $\pm$ 8,02	47,1 $\pm$ 6,72	53,6 $\pm$ 5,02	41,9 $\pm$ 9,37
300	30,0 $\pm$ 16,38	22,9 $\pm$ 16,45	9,2 $\pm$ 14,72	3,6 $\pm$ 8,86	33,6 $\pm$ 17,34	6,99 $\pm$ 13,69

Signifikante Differenzen ($P \leq 0,05$; Scheffé-Test):

10 Minuten ac, ad, af, bc, bf, ce, de, ef
300 Minuten ac, ad, af, bc, bd, bf, ce, de, ef

Tab. 3: Einfluß verschiedener Auftaumethoden mit und ohne Variation der Temperatur nach dem Auftauen auf den ATP-Gehalt (nMol/10⁶ Spermien) von TGN₁-Bullensperma; $\bar{x} \pm s$ von jeweils 36 Proben in mittleren französischen Pailletten (0,5 ml), die aus je einem Einzelejakulat von 36 Bullen stammen. Pro Probe wurden 2 Pailletten je Ejakulat gepoolt.

Untersuchungs- zeitpunkt (Minuten nach Auftau- beginn)	Auftaumethoden mit und ohne Nachauftaubebehandlungen					
	a) +75°C/9 Sek.	b) +40°C/30 Sek.	c) +35°C/13 Sek. anschließend Eiswasserbad	d) Spermatherm	e) +40°C/30 Sek. mit anschlie- ßender Abküh- lung	f) +20°C/20 Sek. mit anschlie- ßender progres- siver Erwärmung
10	8,33 $\pm$ 2,548	7,95 $\pm$ 2,743	6,46 $\pm$ 1,737	6,43 $\pm$ 1,790	6,65 $\pm$ 1,879	5,46 $\pm$ 1,598
300	6,38 $\pm$ 3,023	5,02 $\pm$ 2,775	4,03 $\pm$ 2,602	2,34 $\pm$ 1,859	5,63 $\pm$ 2,289	2,50 $\pm$ 1,691

Signifikante Differenzen ($P \leq 0,05$; Scheffé-Test):

10 Minuten af, bf

300 Minuten ac, ad, af, bd, bf, de, ef

Tab. 4: Einfluß verschiedener Auftaumethoden mit und ohne Variation der Temperatur nach dem Auftauen auf den AEC-Wert von TGN₂-Bullensperma; $\bar{x} \pm s$ von jeweils 36 Proben in mittleren französischen Pailletten (0,5 ml), die aus je einem Einzelejakulat von 36 Bullen stammen. Pro Probe wurden 2 Pailletten je Ejakulat gepoolt.

Untersuchungs- zeitpunkt (Minuten nach Auftau- beginn)	Auftaumethoden mit und ohne Nachauftaubebehandlungen					
	a) +75°C/9 Sek.	b) +40°C/30 Sek.	c) +35°C/13 Sek. anschließend Eiswasserbad	d) Spermatherm	e) +40°C/30 Sek. mit anschlie- ßender Abküh- lung	f) +20°C/20 Sek. mit anschlie- ßender progres- siver Erwärmung
10	$0,66 \pm 0,060$	$0,62 \pm 0,060$	$0,63 \pm 0,052$	$0,63 \pm 0,060$	$0,62 \pm 0,059$	$0,59 \pm 0,062$
300	$0,60 \pm 0,102$	$0,55 \pm 0,111$	$0,54 \pm 0,104$	$0,44 \pm 0,130$	$0,59 \pm 0,078$	$0,43 \pm 0,114$

Signifikante Differenzen ($P \leq 0,05$; Scheffé-Test):

10 Minuten af

300 Minuten ad, af, bd, bf, cd, cf, de, ef

abfall zu $+35^{\circ}\text{C}/13$ Sekunden mit Eiswasserbad bei beiden Beurteilungen signifikant ($P \leq 0,05$), zum Spermatherm dagegen nur nach 5 Stunden Inkubation. Bei der Betrachtung der ATP-Gehalte und AEC-Werte sind nur die großen Differenzen zum Spermatherm nach dem Thermoresistenztest signifikant ($P \leq 0,05$). Zwischen den beiden Verfahren $+35^{\circ}\text{C}/13$ Sekunden mit Eiswasserbad und Spermatherm differieren die Ergebnisse der ersten Beurteilung nur geringgradig, wogegen sie nach dem Thermoresistenztest deutlich besser sind für die Wasserbadmethode und für den AEC-Wert signifikant ($P \leq 0,05$) sind.

Ein Vergleich der Ergebnisse der Auftaumethode $+40^{\circ}\text{C}/30$ Sekunden mit und ohne Variation der Temperaturen nach dem Auftauen (Methoden b und e; Tab. 2, 3, 4) zeigte keinen Spermaqualitätsverlust durch die Abkühlung auf. Nach dem Thermoresistenztest weisen sogar alle drei Spermienparameter bei dem Verfahren mit Abkühlung geringgradig höhere Werte auf (alle Differenzen $P > 0,05$).

Die Auftaumethode $+20^{\circ}\text{C}/20$ Sekunden erbrachte im Vergleich zu den anderen Verfahren mit und ohne Nachauftaubehandlung die mit Abstand schlechteste Spermaqualität. Die Ergebnisse nach dem Thermoresistenztest sind ähnlich wie nach dem Auftauen mit dem Spermatherm.

In der Abbildung 5 sind die Temperaturverlaufskurven der Auftaumethoden mit Behandlungen nach dem Auftauen aufgezeichnet.

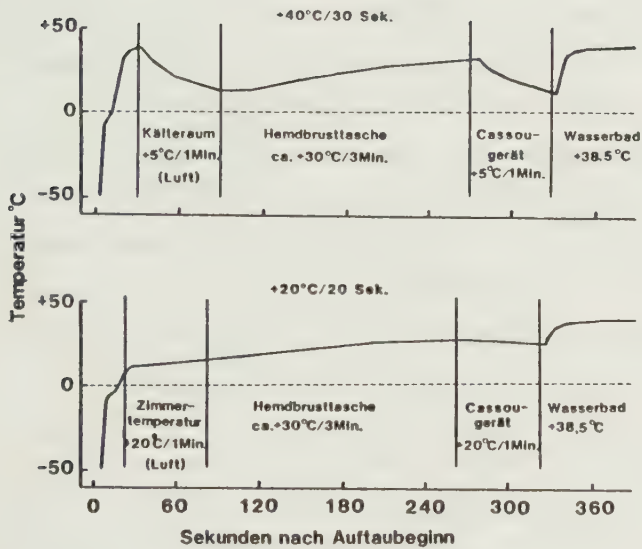


Abb. 5: Einfluß von Nachauftaubehandlungen bei zwei verschiedenen Auftaumethoden (+40°C/30 Sek. und +20°C/20 Sek.) auf den Temperaturverlauf innerhalb der Paillette

Die Messungen der Temperatur im Innenraum der Pailletten zeigten, daß bei der Auftaumethode $+40^{\circ}\text{C}/30$ Sek. mit anschließender 2-maliger Abkühlung (Methode e, Tab. 2, 3, 4) relativ starke Schwankungen der Temperaturverlaufskurve gegeben sind (Abb. 5). Im Vergleich dazu ist bei der Auftaumethode $+40^{\circ}\text{C}/30$ Sek. ohne nachfolgende Abkühlung (Methode b, Tab. 2, 3, 4) ein rascher Anstieg auf $+38^{\circ}\text{C}$, gefolgt von einem Plateau mit nahezu gleichbleibender Temperatur zu beobachten (Abb. 6). Bei der Methode f (Tab. 2, 3, 4), die durch eine geringe Auftautemperatur $+20^{\circ}\text{C}/20$ Sek. charakterisiert war, erfolgte der rasche Anstieg der Temperatur nur bis zu einem Niveau von ca. $+6^{\circ}\text{C}$ (Abb. 5). Die anschließende Phase bis zum Erreichen der Körpertemperatur ist im Vergleich zu dem Verfahren mit höheren Auftauraten (siehe Abb. 6) jedoch deutlich verlängert.

3.2.2. Auftauen mit Mikrowellen

In der Tabelle 5 sind die Ergebnisse, die beim Auftauen im Mikrowellenherd (Punkt 3.1.8.4.) erzielt wurden, zusammen mit den Werten der Auftaumethode $+75^{\circ}\text{C}/9$ Sekunden (Punkt 3.1.8.2.) dargestellt. Die Gegenüberstellung soll den Vergleich des Mikrowellenverfahrens mit den herkömmlichen Verfahren erleichtern.

Tab. 5: Einfluß zweier verschiedener Auftaumethoden auf die Spermaqualität von TGN₂-Bullensperma; $\bar{x} \pm s$ von je 36 Proben in mittleren französischen Pailletten (0,5 ml), die aus je einem Einzel-ejakulat von 36 Bullen stammten. Pro Probe wurden 2 Pailletten pro Ejakulat gepoolt.

Untersuchungs- zeitpunkt (Minuten nach dem Auftaubeginn)	Spermien- parameter	Auftaumethode	
		+75°C/9 Sek.	Mikrowellenherd
10	Vorwärtsbe- weglichkeit (V %)	56,6 $\pm$ 5,54	48,5 $\pm$ 9,01 ***
	ATP-Gehalt	8,33 $\pm$ 2,548	7,83 $\pm$ 3,873 n.s.
	AEC-Wert	0,66 $\pm$ 0,060	0,62 $\pm$ 0,095*
	NAR (%) ¹⁾	55,3 $\pm$ 6,82	45,7 $\pm$ 9,02 ***
300	Vorwärtsbe- weglichkeit (V %)	30,0 $\pm$ 16,38	6,8 $\pm$ 10,83***
	ATP-Gehalt	6,38 $\pm$ 3,023	3,90 $\pm$ 2,795***
	AEC-Wert	0,60 $\pm$ 0,102	0,48 $\pm$ 0,118***
	NAR (%) ¹⁾	25,3 $\pm$ 10,08	11,6 $\pm$ 9,95 ***

n.s. (P > 0,05)

* (P ≤ 0,05)

*** (P ≤ 0,001)

t-Test

¹⁾ NAR % = Prozentsatz Akrosome mit normalem apikalen Rand

Die Prozentsätze der vorwärtsbeweglichen Spermien und der Anteil an Spermien mit intakten Akrosomen waren bei der Methode +75°C/9 Sekunden signifikant ($P \leq 0,001$) besser nach der ersten Beurteilung als nach dem Auftauen mit Mikrowellen. Der ATP-Gehalt und der AEC-Wert zeigten dagegen nur eine geringe Differenz zugunsten der Methode +75°C/9 Sek., die für den AEC-Wert schwach signifikant ($P \leq 0,05$) war. Nach dem Thermoresistenztest war dann eine starke Verschlechterung aller vier Spermienparameter bei der Auftaumethode mit Mikrowellen festzustellen (alle Differenzen $P \leq 0,001$).

3.2.3. Einfluß der Auftaumethode mit anschließender Belastung auf Spermaqualität und Temperaturverlauf

Die Ergebnisse des Einflusses von drei unterschiedlichen Auftaumethoden mit demselben Belastungstest nach dem Auftauen (Punkt 3.1.10.) auf Motilität, Adenosinnucleotidgehalt und Prozentsatz intakter Akrosome sind in der Tabelle 6 dargestellt.

Die geringen Differenzen der Spermienparameter zwischen den drei Verfahren sind nach Auswertung mit dem Scheffé-Test nicht signifikant ($P > 0,05$).

Bei Betrachtung der Ergebnisse von Motilität, ATP-Gehalt und Prozentsatz intakter Akrosome nach dem Thermoresistenztest zeigt sich eine ansteigende Tendenz von der kürzeren zur längeren Auf-

Tab. 6: Einfluß von drei unterschiedlichen Auftaumethoden mit denselben Behandlungen nach dem Auftauen auf die Spermaqualität; $\bar{x} \pm s$ von je 10 Proben in mittleren französischen Pailletten (0,5 ml), die aus je einem Einzelejakulat von 10 Bullen stammten. Pro Probe wurden 2 Pailletten je Ejakulat gepoolt. Keine Differenz ist signifikant (Scheffé-Test)

Untersuchungs- zeitpunkt (Minuten nach dem Auftaubeginn)	Spermien- parameter	Auftaumethoden		
		+35°C/13 Sek.	+35°C/20 Sek.	+40°C/30 Sek.
10	Vorwärtsbe- weglichkeit (V %)	49,0 $\pm$ 3,38	48,5 $\pm$ 8,01	50,3 $\pm$ 6,61
	ATP-Gehalt	7,37 $\pm$ 2,101	7,00 $\pm$ 2,026	8,51 $\pm$ 2,754
	AEC	0,543 $\pm$ 0,054	0,529 $\pm$ 0,058	0,522 $\pm$ 0,036
	NAR (%) ¹⁾	53,6 $\pm$ 11,27	52,1 $\pm$ 8,66	55,2 $\pm$ 10,81
300	Vorwärtsbe- weglichkeit (V %)	14,8 $\pm$ 19,98	17,0 $\pm$ 18,06	20,8 $\pm$ 15,19
	ATP-Gehalt	5,17 $\pm$ 2,637	5,88 $\pm$ 1,996	6,07 $\pm$ 1,922
	AEC	0,493 $\pm$ 0,067	0,502 $\pm$ 0,067	0,477 $\pm$ 0,071
	NAR (%) ¹⁾	23,2 $\pm$ 9,96	24,8 $\pm$ 9,32	25,8 $\pm$ 7,99

¹⁾ NAR (%) = Prozentsatz Akrosome mit normalem apikalen Rand

tauzeit. Bei der längsten Auftauzeit wird in der Paillette eine Endtemperatur von $+38^{\circ}\text{C}$ erreicht, während sie nach 13 Sekunden bei ca. $+5^{\circ}\text{C}$ und nach 20 Sekunden bei $+22^{\circ}\text{C}$ lag (Abb. 6). Die AEC-Werte dagegen verhalten sich uneinheitlich und sind bei beiden Beurteilungen am niedrigsten bei den Verfahren $+40^{\circ}\text{C}/30$ Sekunden.

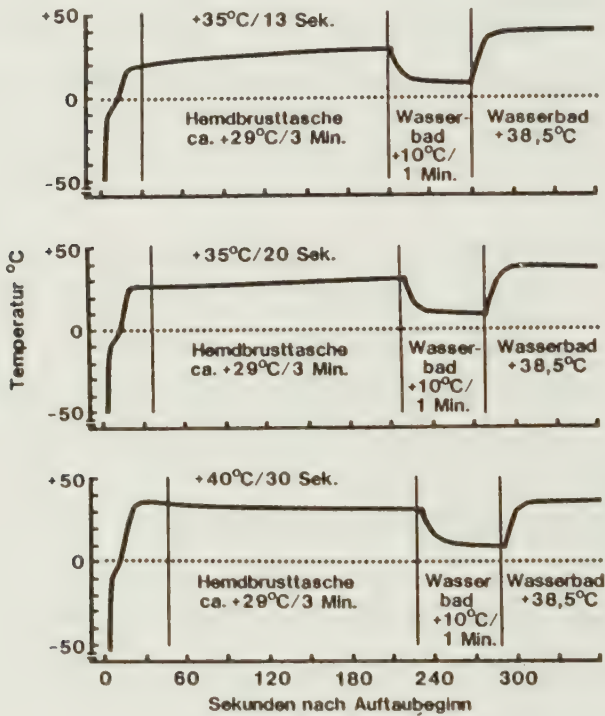


Abb. 6: Einfluß von drei unterschiedlichen Auftaumethoden mit demselben nachfolgenden Belastungstest auf den Temperaturverlauf

3.2.4. Einfluß von Temperaturschwankungen unter dem Nullpunkt auf die Spermaqualität

Die Versuche (Punkt 3.1.11.) wurden durchgeführt, um den Einfluß von Temperaturen zwischen -60°C und -5°C auf die Spermienparameter Motilität und Adenosinnucleotidgehalt zu überprüfen, wenn die Einwirkungsdauer länger ist als beim routinemäßigen Auftauvorgang. Die an der Landesgewerbeanstalt Bayern festgestellten Gefrierpunkte für die drei untersuchten Ejakulate waren $-6,5^{\circ}\text{C}$, $-6,0^{\circ}\text{C}$ und $-5,5^{\circ}\text{C}$. Die Ergebnisse des Versuches mit nachfolgendem Auftauen nach der Erwärmung sind in der Tabelle 7 zusammengefaßt. Bei der 1-minütigen Inkubationsdauer findet sich bei allen Temperaturstufen nur ein geringgradiger Abfall der Spermaqualität gegenüber den Vergleichswerten. Durch die Verlängerung der Inkubationsdauer ergaben sich dagegen bei den Temperaturen von -5°C und -10°C nach 10 Minuten deutlich niedrigere Ergebnisse und bei -20°C nach 60 Minuten. Temperaturen von -40°C bzw. -60°C zeigten im Vergleich zu den vorhergenannten Temperaturen nur noch einen geringen Einfluß auf die Spermienparameter. Trotzdem ist eine Tendenz zu nachteiligen Auswirkungen zu erkennen, und zwar auch schon bei den kurzfristigen Erwärmungen über die Dauer von 1 Minute. Auf eine statistische Analyse wurde wegen des geringen Probenumfanges ($n = 4$) verzichtet.

Die Ergebnisse des zweiten Versuches (Tab. 8), bei dem der TGN₂-Samen nach der Erwärmung erneut tiefgefroren wurde, ließen im Vergleich zur vorhergehenden Versuchsanordnung einen deutli-

Tab. 7: Einfluß einer Erwärmung von -196°C auf verschiedene Temperaturstufen unter 0°C mit nachfolgendem Auftauen bei $+40^{\circ}\text{C}/30$ Sekunden auf die Spermaqualität von TGN_2 -Bullensperma; $\bar{x} \pm s$, aus 4 Proben von 3 Einzelejakulaten jeweils eines Bullen; von einem Ejakulat wurden zwei Proben untersucht und von den anderen zwei jeweils eine, bei denen 2 Pailletten gepoolt wurden

Temperatur- stufe ($^{\circ}\text{C}$)	Zeit- dauer (Min.)	Motilität (V%)	ATP-Gehalt (nMol/10 ⁶ Spermien)	AEC- Wert
-5	1	51,8 $\pm$ 3,15	7,99 $\pm$ 1,434	0,55 $\pm$ 0,052
	10	31,3 $\pm$ 4,33	6,26 $\pm$ 1,292	0,50 $\pm$ 0,055
	60	28,8 $\pm$ 4,33	6,22 $\pm$ 1,340	0,51 $\pm$ 0,049
-10	1	45,6 $\pm$ 5,54	7,49 $\pm$ 1,181	0,54 $\pm$ 0,045
	10	35,6 $\pm$ 5,54	6,15 $\pm$ 1,209	0,49 $\pm$ 0,076
	60	16,3 $\pm$ 7,22	4,79 $\pm$ 1,801	0,49 $\pm$ 0,104
-20	1	51,9 $\pm$ 4,27	8,37 $\pm$ 2,889	0,60 $\pm$ 0,066
	10	48,8 $\pm$ 4,33	7,23 $\pm$ 1,781	0,60 $\pm$ 0,033
	60	23,1 $\pm$ 3,75	4,39 $\pm$ 1,313	0,42 $\pm$ 0,051
-40	1	53,8 $\pm$ 2,50	9,12 $\pm$ 3,314	0,55 $\pm$ 0,113
	10	55,0 $\pm$ 2,04	8,48 $\pm$ 1,145	0,54 $\pm$ 0,073
	60	48,8 $\pm$ 1,44	7,37 $\pm$ 1,814	0,53 $\pm$ 0,088
-60	1	54,3 $\pm$ 1,25	8,99 $\pm$ 0,421	0,59 $\pm$ 0,038
	10	51,9 $\pm$ 2,39	8,15 $\pm$ 0,990	0,56 $\pm$ 0,023
	60	53,8 $\pm$ 3,23	8,78 $\pm$ 0,634	0,55 $\pm$ 0,031
Vergleichswerte auf- getaut bei $+40^{\circ}\text{C}/$ 30 Sekunden		55,6 $\pm$ 1,25	9,26 $\pm$ 1,014	0,62 $\pm$ 0,033

Tab. 8: Einfluß einer Erwärmung von -196°C auf verschiedene Temperaturstufen unter 0°C mit nachfolgender erneuter Einlagerung in flüssigem Stickstoff für 24 Stunden und dann Auftauen bei $+40^{\circ}\text{C}/30$ Sekunden auf die Spermaqualität von TGN₂-Bullensperma; $\bar{x} \pm s$, aus 4 Proben von 3 Einzelejakulaten jeweils eines Bullen; von einem Ejakulat wurden zwei Proben untersucht und von den anderen zwei jeweils eine, bei denen 2 Pailletten gepoolt wurden

Temperatur- stufe ($^{\circ}\text{C}$)	Zeit- dauer (Min.)	Motilität (V%)	ATP-Gehalt (nMol/ 10^6 Spermien)	AEC- Wert
-5	1	10,0 + 7,36	3,87 + 1,051	0,46 + 0,034
	10	0,0 $\pm$ 0,00	1,91 $\pm$ 0,262	0,34 $\pm$ 0,090
	60	0,0 $\pm$ 0,00	1,51 $\pm$ 0,660	0,30 $\pm$ 0,027
-10	1	5,6 + 3,75	3,30 + 0,528	0,43 + 0,020
	10	0,0 $\pm$ 0,00	1,84 $\pm$ 0,598	0,35 $\pm$ 0,022
	60	0,0 $\pm$ 0,00	2,03 $\pm$ 0,804	0,35 $\pm$ 0,501
-20	1	36,9 + 18,41	5,21 + 1,359	0,49 + 0,054
	10	29,9 $\pm$ 30,03	3,72 $\pm$ 2,262	0,47 $\pm$ 0,052
	60	3,13 $\pm$ 6,25	1,92 $\pm$ 1,479	0,41 $\pm$ 0,056
-40	1	53,1 + 2,39	8,07 + 0,488	0,54 + 0,066
	10	48,1 $\pm$ 6,25	7,83 $\pm$ 0,283	0,56 $\pm$ 0,067
	60	41,9 $\pm$ 7,18	6,06 $\pm$ 0,674	0,55 $\pm$ 0,064
-60	1	52,5 + 2,04	8,19 + 1,067	0,48 + 0,041
	10	53,1 $\pm$ 1,25	8,24 $\pm$ 1,655	0,52 $\pm$ 0,078
	60	53,8 $\pm$ 1,44	7,36 $\pm$ 1,269	0,47 $\pm$ 0,036
Vergleichswerte auf- getaut bei $+40^{\circ}\text{C}/$ 30 Sekunden		55,6 $\pm$ 1,25	9,26 $\pm$ 1,014	0,62 $\pm$ 0,033

chen Abfall der Spermienqualität erkennen, der durch die Verlängerung der Inkubationsdauer verstärkt wurde. So ist bei den Temperaturen von -5°C und -10°C nur noch bei einer Minute Inkubation eine geringe Motilität nachweisbar. Ebenso fielen der ATP-Gehalt und der AEC-Wert gegenüber den Vergleichswerten stark ab.

Die gemeinsame Betrachtung beider Versuche ergab, daß ein erneutes Einfrieren vor allem nach höheren Erwärmungstemperaturen zu einer deutlichen Schädigung der Spermien führt.

3.2.5. Temperaturmessungen im Inneren einer Paillette mit einem Thermoelement

3.2.5.1. Temperaturverlauf und Auftauzeiten bei unterschiedlichen Auftaumethoden

Es zeigte sich deutlich, daß die Auftaumethoden mit einem Wasserbad das schnellste Auftauen gewährleisten (Tab. 9). So ist z.B. bei gleicher Auftautemperatur die Auftauzeit in der Luft (+21,8°C) um das ca. 13-fache länger als der vergleichbare Wert im Wasserbad (+20°C), im Spermatherm (+38°C) um das ca. 6-fache länger als im Wasserbad (+40°C).

Vergleicht man die beiden Auftaumethoden mit dem Spermatherm, ergab sich für das Auftauen der Paillette mit vorgewärmtem Cassougerät (+38°C) eine um das Doppelte verlängerte Auftauzeit gegen-

Tab. 9: Auftauzeiten von TGN₂-Bullensperma, abgepackt in mittlere Pailletten (0,5 ml) bei² unterschiedlichen Auftauverfahren ($\bar{x} \pm s$ aus 5 Messungen)

Auftaumethoden	Zeit in Sek. bis zum Erreichen von 0°C					
	-196°C bis 0°C			-20°C bis 0°C		
	$\bar{x}$	$\pm$	s	$\bar{x}$	$\pm$	s
+75°C	8,0	$\pm$	0,3	4,0	$\pm$	0,1
+40°C	12,0	$\pm$	0,2	8,0	$\pm$	0,2
+35°C	12,8	$\pm$	0,2	8,6	$\pm$	0,4
+20°C	17,0	$\pm$	0,2	12,2	$\pm$	0,4
stehendes Leitungswasser (Ø +13,4°C)	34,5	$\pm$	5,7	28,5	$\pm$	6,2
fließendes Leitungswasser (Ø +13,7°C)	19,9	$\pm$	1,2	14,6	$\pm$	1,6
in der Hand (Handtemperatur +35°C)	42,4	$\pm$	3,7	28,7	$\pm$	2,5
Spermatherm (+38°C) (Paillette allein)	76,0	$\pm$	14,8	47,0	$\pm$	9,0
Spermatherm (+38°C) (Paillette + Cassougerät + Plastikhülle)	133,0	$\pm$	7,3	94,2	$\pm$	9,3
in der Hemdbrusttasche (Ø +30,2°C)	203,9	$\pm$	3,2	129,2	$\pm$	4,7
in der Luft (Ø +21,8°C)	215,5	$\pm$	10,1	151,2	$\pm$	9,1
in der Luft (Ø +5°C)	583,8	$\pm$	140,1	486,0	$\pm$	91,2

über dem Auftauen der Paillette allein (Abb. 7). Ebenso verhält es sich bei den beiden Auftaumethoden mit Leitungswasser, bei denen das Auftauen im fließenden doppelt so schnell erfolgt als im stehenden Leitungswasser (Abb. 8).

Die Temperaturverläufe der Abbildung 9 veranschaulichen die stark verlängerten Verweildauern der Spermien in der kritischen Zone zwischen -20°C und 0°C bei allen Auftaumethoden ohne Wasser als Wärmeüberträger. Dies ist der Bereich, in dem der Wechsel vom festen in den flüssigen Aggregatzustand des Verdünners stattfindet.

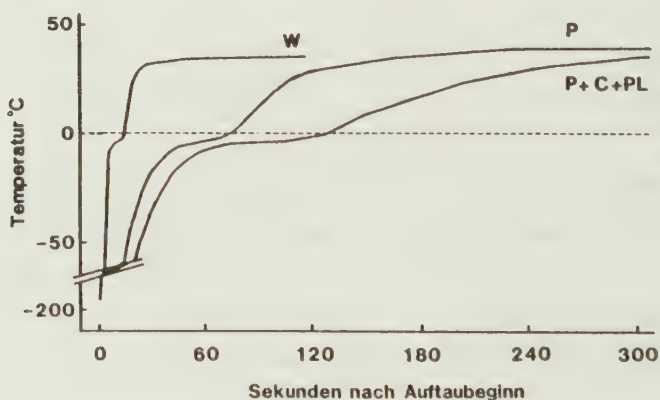


Abb. 7: Temperaturverlauf in einer mittleren Paillette (0,5 ml) während des Auftauens im Spermatherm. W: Wasserbad (Vergleichswert); P: Paillette allein aufgetaut. P+C+PL: Die tiefgefrorene Paillette wurde in das vorgewärmte Cassougerät ($+38^{\circ}\text{C}$) gesteckt, die Plastikhülle ebenfalls vorgewärmt ($+38^{\circ}\text{C}$) darübergestülpt und dann in den Spermatherm versenkt.

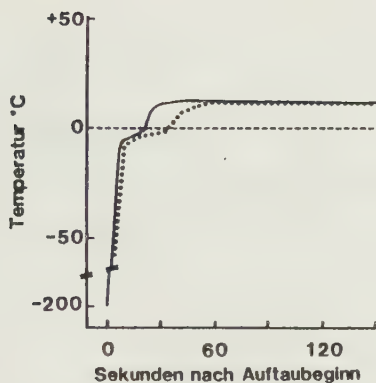


Abb. 8: Temperaturverlauf in einer mittleren Paillette (0,5 ml) während des Auftauens in fließendem Leitungswasser (+13,5°C) und stehendem Leitungswasser (+13,5°C).

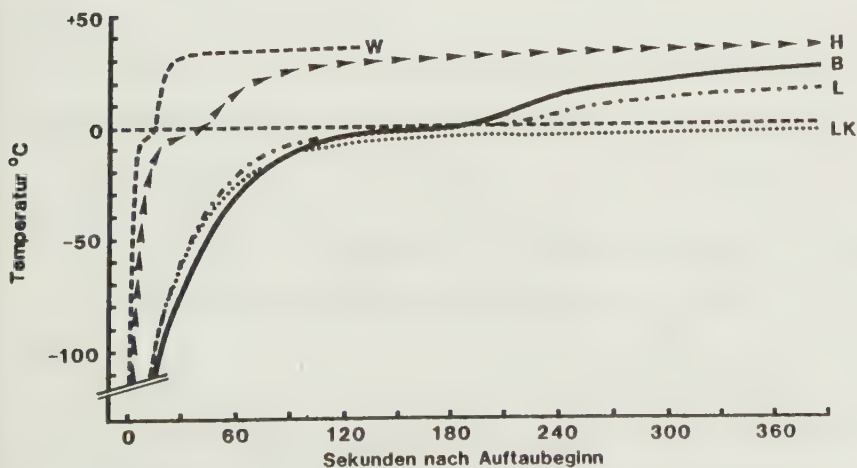


Abb. 9: Temperaturverlauf in einer mittleren Paillette bei verschiedenen Auftaumethoden. W: Wasserbad +35°C; H: Faust des Untersuchers ca. +35°C; B: Hemdbrusttasche ca. +30°C; L: Luft (Laborraum ca. +20°C); LK: Luft (Kühlraum +5°C).

3.2.5.2. Einfluß der Bewegung der Paillette während des Auftauens

Die Innentemperatur der Pailletten, die während des Auftauens nicht bewegt wurden, betrug danach durchschnittlich $+6^{\circ}\text{C}$ mit einem Minimalwert von $+2^{\circ}\text{C}$ und einem Maximalwert von $+10^{\circ}\text{C}$ ($n = 5$), während die in den bewegten Parallelproben bei durchschnittlich $+22^{\circ}\text{C}$ (Min. $+19,5^{\circ}\text{C}$; Max. $+23,5^{\circ}\text{C}$) lag.

Es zeigte sich, daß bei gleicher Auftauzeit von 13 Sekunden durch die Bewegung eine um durchschnittlich $+17^{\circ}\text{C}$ höhere Innentemperatur der Pailletten nach dem Auftauen erreicht wurde als ohne Bewegung.

3.2.5.3. Einfluß des Abtrocknens nach dem Auftauen im Wasserbad

In der Abbildung 10 ist der Temperaturverlauf dargestellt, wenn die Pailletten, nachdem sie im Wasserbad auf eine Temperatur von $+40^{\circ}\text{C}$ gebracht wurden, unterschiedlichen Umgebungstemperaturen der Luft ausgesetzt wurden, wobei die Hälfte der Proben abgetrocknet, während die andere Hälfte nicht weiter behandelt wurde.

Nasse Pailletten paßten sich der Umgebungstemperatur bedeutend rascher an als trockene Pailletten. Dies gilt für beide hier gewählten Umgebungstemperaturen von $+5^{\circ}\text{C}$ bzw. $+23^{\circ}\text{C}$.

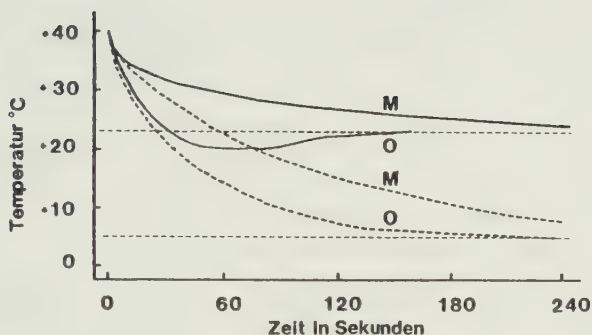


Abb. 10: Temperaturverlauf in mittleren Pailletten, die verschiedenen Umgebungstemperaturen mit und ohne abzutrocknen ausgesetzt wurden. — Umgebungstemperatur +23°C; --- Umgebungstemperatur +5°C; O ohne abzutrocknen, M mit Abtrocknen

3.2.6. Einfluß verschiedener Auftauverfahren auf die Befruchtungsergebnisse

In den Monaten Oktober, November und dem halben Dezember setzten 10 Tierärzte und 22 Besamungstechniker insgesamt 26112 Samenportionen ein. Davon wurden 12800 mit der Auftaumethhode +35°C/13 Sekunden und 13312 mit der Methode +40°C/30 Sekunden alternierend aufgetaut. In den Tabellen 10 und 11 sind die Besamungsergebnisse der beiden Auftauverfahren einander gegenübergestellt. Die Überprüfung der Ergebnisse sowohl unkorrigiert als auch korrigiert

Tab. 10: Vergleich der Besamungsergebnisse bei Anwendung zweier verschiedener Auftauverfahren aufgegliedert nach Besamungszeitpunkt und Besamungsgruppe (EB = Anzahl der Erstbesamungen, NR = Non-Return und NRR % = Non-Return-Rate in %)

Monat	Besamer- gruppe	Auftaumethode					
		+ 35°C/13 Sek.			+40°C/30 Sek.		
		EB	NR	NRR(%)	EB	NR	NRR(%)
Oktober	Tierärzte	1049	686	65,4	1072	658	61,4
	Techniker	3720	2479	66,6	3903	2631	67,4
	Total	4769	3165	66,4	4975	3289	66,1
November	Tierärzte	1197	760	63,5	1367	877	64,2
	Techniker	3920	2588	66,0	4279	2909	68,0
	Total	5117	3348	65,4	5646	3786	67,1
Dezember	Tierärzte	655	421	64,3	614	400	65,1
	Techniker	2259	1475	65,3	2077	1362	65,6
	Total	2914	1896	65,1	2691	1762	65,5
Gesamt	Tierärzte	2901	1867	64,4	3053	1935	63,4
	Techniker	9899	6542	66,1	10259	6902	67,3
	Total	12800	8409	65,7	13312	8837	66,4

Differenzen zwischen den Auftaumethoden n.s. (χ^2 -Test, $P > 0,05$)

Tab. 11: Vergleich der Besamungsergebnisse bei Anwendung zwei verschiedener Auftauverfahren korrigiert nach Monat, Besamergruppe, Besamer und Bullen (EB = Anzahl der Erstbesamungen, NR = Non-Return und NRR % = Non-Return-Rate in %)

korrigiert nach	Auftaumethode					
	+ 35°C/13 Sek.			+40°C/30 Sek.		
	EB	NR	NRR(%)	EB	NR	NRR(%)
Monate und Besamergruppe	12800	8382	65,5	13312	8802	66,1
Monate und Besamer	12800	8382	65,5	13312	8802	66,1
Monate, Bullen und Besamer	12800	8376	65,5	13312	8779	66,0
Monate, Bullen und Besamergruppe	12800	8376	65,4	13312	8779	66,0
unkorrigiert	12800	8409	65,7	13312	8837	66,4

Differenzen zwischen den Auftaumethoden n.s. (χ^2 -Test,
P > 0,05)

(Tab. 10 und 11) nach Besamer, Besamergruppe, Monate und Bullen mit χ^2 -Test ließen keine signifikanten Differenzen erkennen. Insgesamt war unter Einbeziehung aller Erstbesamungen eine geringfügige Steigerung der "60/90 Tage Non-Return-Rate" um nur 0,7 % zugunsten der Auftaumethode mit verlängerter Auftauzeit feststellbar.

3.2.7. Korrelationen zwischen Motilität, ATP-Gehalt und AEC-Wert von aufgetautem TGN₂-Bullensperma

Da die Adenosinnucleotide die Energiequelle für die Motilität darstellen und ihr Nachweis seit einiger Zeit in der Spermatologie Anwendung findet, sollte die Beziehung dieser Parameter zur Motilität in die Untersuchungen miteinbezogen werden. In der Tabelle 12 sind die Korrelationskoeffizienten dargestellt. Den Berechnungen liegen die Ergebnisse aus dem Abschnitt 3.2.1. (Tab. 2, 3, 4) zugrunde.

Tab. 12: Korrelationen zwischen den Parametern von TGN₂-Bullensperma aus 6 verschiedenen Auftauversuchen mit insgesamt 432 Spermauntersuchungen

Beziehung	Korrelationskoeffizient (r)
Motilität x ATP-Gehalt	0,75 ***
Motilität x AEC-Wert	0,69 ***

*** $P \leq 0,001$ (lineare Korrelation)

4. DISKUSSION

Das umfangreiche Material, das zur Fragestellung der Handhabung des Tiefgefriersamens in der Besamungspraxis publiziert wurde (SAACKE 1978, SENGER 1980, BROWN et al. 1982, PAPA 1982), zeigt deutlich die Schwierigkeiten auf, zu einer allgemein gültigen Empfehlung zu kommen, die alle Einflußfaktoren berücksichtigt und zu einer optimalen Spermaqualität zum Zeitpunkt der Insemination führt.

In dieser Arbeit wurden drei Problembereiche der Behandlung des Tiefgefriersamens in der Praxis aufgegriffen und sowohl nach bisher üblichen Verfahren als auch nach neu in die Spermatologie aufgenommenen Methoden überprüft.

Zur Beurteilung der Spermienqualität wurden neben dem Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien, der seit Jahren bei fast allen Untersuchungen eingesetzt wird, noch die Adenosinnucleotid-Konzentrationen als Parameter für die Spermienvitalität verwendet. Die enge Beziehung zwischen dem Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien und ATP-Gehalt von aufgetautem TGN₂-Bullensperma, die schon PRINZEN (1977), FOULKES und MacDONALD (1979), KÄHN (1981a) und VELEZ CUEVAS (1982) fanden, konnte in der vorliegenden Arbeit ebenso bestätigt werden, wie die hohe Korrelation zwischen Motilität und AEC-Wert (KÄHN et al. 1982, VELEZ CUEVAS 1982; Tab. 12).

Die Morphologie des Akrosoms wurde bei einigen Fragestellungen miterfaßt, da Veränderungen seiner Struktur außer vom Bullen und einzelnen Ejakulaten auch von der Handhabung des Samens abhängig sind. Die Akrosommorphologie weist eine gute Korrelation zu den Befruchtungsergebnissen auf (SAACKE 1970, SAACKE und WHITE 1972).

Bei den hier vorliegenden Untersuchungen bildete der Auftauprozeß einen Schwerpunkt, da er, wie SAACKE (1978) es anschaulich beschreibt, einen dramatischen Einfluß auf die Lebensfähigkeit der Spermien besitzt. Entscheidend für das Ergebnis einer Auftaumethode ist die Geschwindigkeit des Temperaturanstieges, die wiederum von der Beschaffenheit des Auftaumediums abhängig ist. Deshalb wurde eine Trockenauftaumethode, d.h. ein Verfahren mit Luft als Wärmeüberträger ($+38^{\circ}\text{C}/3$ Min., Spermatherm) mit zwei Wasserbadauftaumethoden von $+40^{\circ}\text{C}$ und 30 Sekunden und von $+75^{\circ}\text{C}$ und 9 Sekunden (Punkt 3.2.1.) verglichen. Die Temperaturen nach dem Ende des Auftauprozesses lagen für alle drei Methoden zwischen $+35^{\circ}\text{C}$ bis $+38^{\circ}\text{C}$. Bei der Betrachtung der Auftauzeiten, angegeben in Sekunden bis zum Erreichen von 0°C (Tab. 9), ergibt sich für den Spermatherm ein ca. 6- bis 10-fach längerer Auftauvorgang als bei $+40^{\circ}\text{C}/30$ Sekunden und $+75^{\circ}\text{C}/9$ Sekunden.

Die Beschleunigung der Auftaugeschwindigkeit war von einer Verbesserung der Spermaqualität begleitet (Tab. 2, 3, 4). Die Differenzen der Wasserbadmethoden zu der Trockenauftaumethode nach dem Thermoresistenztest waren für die drei Parameter Prozentsatz vor-

wärtsbeweglicher Spermien, ATP-Gehalt und AEC-Wert signifikant ($P \leq 0,05$).

Die niedrigen Ergebnisse des Spermatherm mit seiner Auftaupemperatur von $+38^{\circ}\text{C}$ sind darauf zurückzuführen, daß in dem Köcher des erwärmten Metallblocks Luft mit ihrer geringen Wärmeleitfähigkeit als Auftaumedium fungiert. Die gefundene Verbesserung der Spermienqualität durch schnelles Auftauen bestätigen die Untersuchungen von ROBBINS et al. (1972), SAACKE et al. (1974), WIGGIN und ALMQUIST (1975), ALMQUIST (1976a), SENGER et al. (1976), GILBERT und ALMQUIST (1978) sowie PAPA und KRAUSE (1981).

Als weiterer Faktor wurde die Auftauzeit untersucht, die die Samenendtemperatur nach dem Auftauen bestimmt. Dabei wurde zunächst die in der Praxis verbreitete Auftaumethode $+35^{\circ}\text{C}/13$ Sekunden (Punkt 3.1.8.2), die den Samen auf eine Temperatur von ca. $+5^{\circ}\text{C}$ bringt, überprüft. Um die Auswirkung einer starken Verzögerung der endgültigen Erwärmung auf $+38,5^{\circ}\text{C}$ zu untersuchen, wurde der Samen anschließend eine Minute lang in einem Eiswasserbad aufbewahrt. Der Vergleich der so behandelten Paillette mit dem Auftauverfahren $+40^{\circ}\text{C}/30$ Sekunden (Samenendtemperatur ca. $+38^{\circ}\text{C}$) zeigte eine deutliche Überlegenheit der Auftaumethode, bei der der Samen rascher auf Körpertemperatur erwärmt wurde. Der Prozentsatz der vorwärtsbeweglichen Spermien vor und nach dem Thermoresistenztest war in den Proben, die 30 Sekunden bei $+40^{\circ}\text{C}$ aufgetaut wurden, signifikant höher ($P \leq 0,05$; Tab. 2).

Mit einem ähnlichen Versuchsansatz - die Verzögerung der Erwärmungsphase auf Körpertemperatur war allerdings nicht so extrem wie in den eigenen Experimenten - kam PAPA (1982) in der Tendenz zu vergleichbaren Ergebnissen. Den positiven Einfluß verlängerter Auftauzeiten auf die Samenqualität hatten auch schon SENGER (1980) und CHANDLER et al. (1984) festgestellt.

Warum es bei einer Verlängerung zwischen der Zeitspanne nach dem eigentlichen Auftauen bis zum Erreichen der Körpertemperatur zu schlechteren Ergebnissen kommt, ist im einzelnen nicht bekannt. DE ABREU et al. (1979) zeigten, daß die Schädigung der Spermien, die ganz offensichtlich durch den nicht kontinuierlichen Anstieg der Temperatur auf physiologische Werte gesetzt wird, unabhängig davon ist, ob die Wärmeapplikation sofort nach dem Auftauen oder nach einer gewissen Wartezeit erfolgt.

Nach HOCHE (1982) werden bei der routinemäßigen Anwendung der KB relativ oft Fehler beim Auftauen der Paillette gemacht, wobei vor allem zu niedrige Wasserbäder anzuführen sind. In einem weiteren Versuch wurde deshalb überprüft, inwieweit das Auftauen bei +20°C/20 Sekunden und anschließende Erwärmung auf Körpertemperatur, also unter Bedingungen, die in der Praxis nicht selten gegeben sein dürften, die Spermienqualität beeinflussen. Die vorliegenden Untersuchungen belegen, daß derartige Fehler beim Auftauen zu einer Beeinträchtigung der Spermienparameter führen. Im Vergleich zu einer von PAPA (1982) empfohlenen Standardmethode

+40°C/30 Sekunden brachte das hier gewählte Verfahren eindeutig schlechtere Resultate (Tab. 2, 3, 4).

Als weitere Gefahrenquelle für auf Körpertemperatur erwärmten Samen werden Variationen der Temperatur angesehen, die in der Zeitspanne bis zur eigentlichen Insemination eintreten können. Diese Vermutungen basieren in erster Linie auf Untersuchungen, in denen die Paillette nach der Erwärmung einer extremen Abkühlung in Temperaturbereiche nahe dem Nullpunkt unterzogen wurde. Dieser Kälteschock führte - wie u.a. ALMQUIST (1976b), SENGER et al. (1976) und BROWN et al. (1982) demonstrierten - zu einer starken Beeinträchtigung der Spermaqualität. Bei weniger deutlichen Temperatursenkungen auf +10°C bzw. +20°C - also Temperaturen, die unter Praxisbedingungen realistischer sind als die zuvor genannten - waren jedoch nur noch geringe bzw. überhaupt keine Schädigungen mehr zu beobachten. Die eigenen Untersuchungen, die solche praxisnahen Variationen der Temperaturen zu simulieren versuchten (Abb. 5), bestätigen diese Erfahrungen. Es konnten im Vergleich zur Kontrolle (Methode b, Tab. 2, 3, 4) durch diese Manipulationen (Methode e, Tab. 2, 3, 4) keine Verschlechterungen der Spermaqualität festgestellt werden.

In einem Besamungsversuch (Punkt 3.1.13.) sollte nun überprüft werden, inwieweit sich die mit Hilfe der spermatologischen Untersuchungen z.T. festgestellten Unterschiede zwischen verschiedenen Auftaumethoden anhand der Befruchtungsergebnisse verifizieren lassen. Die bisher vorliegenden Erfahrungen zeigen eine Tendenz

zu höheren Besamungsergebnissen für Auftaumethoden, mit denen die physiologische Körpertemperatur rasch und kontinuierlich erreicht wird (KUPFERSCHMIED und GAILLARD 1981, ALMQUIST et al. 1979, 1982). Für die eigenen Versuche, in denen die bisherige Standardmethode ($+35^{\circ}\text{C}/13$ Sek.) mit einer Methode, die neuerdings für die Praxis empfohlen wird ($+40^{\circ}\text{C}/30$ Sek; PAPA 1982) verglichen wurde, wurden die kalten Monate Oktober, November und Dezember gewählt. Diese Versuchsanstellung sollte dazu beitragen, den Einfluß von extremen Abkühlungen, wie sie unter unseren klimatischen Verhältnissen vorkommen können, besser abschätzen zu können.

Die leichte Überlegenheit dieser Auftaumethode gegenüber dem bisherigen Standardverfahren ($+35^{\circ}\text{C}/13$ Sek.) scheint unabhängig davon zu sein, ob zusätzliche Schutzmaßnahmen gegen das Abkühlen nach Erreichen der Körpertemperatur getroffen werden, wie z.B. in den eigenen Versuchen und in denen von ALMQUIST et al. (1979, 1982), oder nicht. KUPFERSCHMIED und GAILLARD (1981) konnten nämlich ohne besondere Schutzmaßnahmen auch in den kalten Wintermonaten für die Auftaumethoden mit den höheren Samenendtemperaturen bessere Befruchtungsergebnisse erreichen, als mit den bisher gebräuchlichen Standardverfahren. Daraus ist zu schließen, daß das Risiko einer Beeinträchtigung der Spermaqualität und einer Verschlechterung der Befruchtungsergebnisse durch eine Abkühlung nach Erreichen der physiologischen Werte unter unseren klimatischen Bedingungen überschätzt wird. Diese Aussage wird auch durch die eigenen spermatologischen Untersuchungen gestützt, die - wie bereits dargestellt - keine negativen Auswirkungen von vergleichbaren Temperaturschwankungen ergaben (Tab. 5).

Die oben genannte Methode mit einer Auftautemperatur von $+40^{\circ}\text{C}$ im Wasserbad birgt allerdings in der Praxis die Gefahr in sich, daß durch eine Überschreitung dieser Temperaturgrenze die Spermien durch Übererwärmung geschädigt werden.

Das Auftauen mit Mikrowellen, das schon in der Lebensmitteltechnologie Eingang gefunden hat, könnte hier auf Grund seiner energetischen Möglichkeiten, die Auftauzeit auf Bruchteile einer Sekunde zu reduzieren, eine Alternative zum Wasserbad darstellen. Die vergleichende Gegenüberstellung der Ergebnisse mit der Wasserbadauftaumethode $+75^{\circ}\text{C}/9$ Sekunden, die als ein optimales Verfahren unter Laborbedingungen gilt (ALMQUIST 1976a), läßt darauf schließen, daß das Auftauen mit Mikrowellen, wie es hier bewerkstelligt wurde (nämlich mit einem handelsüblichen Mikrowellenherd), zum gegenwärtigen Zeitpunkt wegen der unbefriedigenden Ergebnisse noch nicht praktikabel ist. Es wäre jedoch vorstellbar, daß nach einer technischen Weiterentwicklung die Mikrowellengeräte eine Alternative zu der bisherigen Auftaumethode mit Wasserbädern werden könnten.

Der dritte Problembereich der vorliegenden Arbeit beschäftigt sich mit der Handhabung des Tiefgefriersamens im Stickstoffbehälter. Die Gefahrenquelle stellt hier die Erwärmung durch unsachgemäße Bedienung dar.

An Hand von Temperaturmessungen im Inneren der Paillette konnten HAHN (1968) und ARBEITER (1977) Erwärmungen in für den Samen ge-

fährliche Bereiche über -100°C nachweisen, z.B. durch zu weites Herausziehen der Paillette aus dem Container.

Nach den Erfahrungen anderer Autoren treten bei einem starken Anstieg der Temperatur Beeinträchtigungen der Spermaqualität ein. BADER (1971), der TGN₂-Bullensperma auf -80°C bis -20°C erwärmte und wieder einfrore, fand einen schädigenden Effekt, der umso stärker war, je weiter die Temperatur zum Nullpunkt angestiegen war. Nach PILCH (1980), der den Einfluß von Temperaturen zwischen -12°C bis -80°C auf die Motilität von Bullensamen untersuchte, erstreckt sich der kritische Temperaturbereich für Paillettensamen zwischen -12°C bis -30°C während des Einfrierens und zwischen -12°C und -45°C während des Auftauens.

Nachdem die Aussagen der zuletzt erwähnten Autoren auf subjektiven Spermienparametern (Akrosommorphologie, Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien) beruhen, wurden in der vorliegenden Arbeit die möglichen Auswirkungen von Temperaturerhöhungen in kritische Bereiche mit Hilfe objektiver Merkmale der Spermaqualität (ATP-Gehalt, AEC-Wert) überprüft.

Es zeigte sich, daß es bei Temperaturen zwischen -60°C und -5°C generell zu einer Schädigung der Samenzellen kommen kann. Dieser Einfluß war umso deutlicher, je höher die Temperatur und je länger die Zeitdauer der Temperaturerhöhung war (Tab. 7, 8). Weiterhin läßt sich aus den Versuchen ableiten, daß ein erneutes Absenken der Temperatur auf -196°C , also eine den praktischen Gegeben-

heiten nachempfundene Versuchsanordnung, die Spermaqualität stärker beeinträchtigt als ein unmittelbares Auftauen nach dieser Erwärmung. Allerdings sind in der Routine der künstlichen Besamung derartige Temperaturerhöhungen, vor allem solche über längere Zeit (10 bzw. 60 Minuten), nur unter extremen Voraussetzungen zu erwarten. Die Temperaturmessungen belegen, daß Pailletten, die dem Behälter entnommen und einer Umgebungstemperatur von ca. $+22^{\circ}\text{C}$ ausgesetzt werden, erst nach etwa 30 Sekunden -60°C erreichen. Unter diesen Umständen ist - wie die eigenen Untersuchungen zeigten - das Risiko der Spermaschädigung relativ klein (Tab. 7, 8). Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß durch wiederholte Temperaturerhöhungen, die beim Einsatz von Tiefgefriersperma im Rahmen der KB unvermeidbar sind, die Spermaqualität so stark beeinträchtigt wird, daß es zu einer Verminderung der Befruchtungsfähigkeit kommen kann. Die Beobachtungen von ARBEITER (1977) sprechen für diese Annahme. Er stellte in Pailletten, die über längere Zeit im Container von Besamungstechnikern lagerten und somit während des routinemäßigen Umgangs wiederholten Temperaturschwankungen ausgesetzt waren, eine deutliche Schädigung der Spermien fest.

SCHLUSSFOLGERUNG

Aus den vorliegenden Ergebnissen können folgende Schlußfolgerungen gezogen werden:

Schnelles Auftauen von tiefgefrorenen Pailletten direkt bis nahe an die Körpertemperatur (z.B. durch Temperaturen von $+40^{\circ}\text{C}$ im Wasserbad, die über 30 Sekunden einwirken) bringt hinsichtlich der Spermaqualität grundsätzlich die besten Ergebnisse. Zur Zeit ist dies in der Praxis nur mit Hilfe von Wasserbädern zu verwirklichen. Das Auftauen mit Mikrowellen erscheint in Zukunft als Alternative zum Wasserbad möglich, wenn die technischen Voraussetzungen für geeignete Geräte geschaffen werden können. Die Gefahr einer Spermenschädigung durch erneutes Abkühlen, die generell bei allen Verfahren mit Samenendtemperaturen im Bereich der Körpertemperatur gegeben ist, kann unter den Bedingungen der Besamungspraxis auf Grund der vorliegenden Ergebnisse als gering angesehen werden. Um das Risiko einer Übererwärmung des Spermas über $+40^{\circ}\text{C}$ hinaus zu vermeiden, sind jedoch für die praktischen Verhältnisse Wasserbäder mit Temperaturen zwischen $+35^{\circ}\text{C}$ und $+38^{\circ}\text{C}$ zu empfehlen. Alle Manipulationen von tiefgefrorenem Sperma im Stickstoffbehälter, die mit einer temporären Erhöhung der Temperaturen über -60°C hinaus verbunden sind, können grundsätzlich die Spermien schädigen. Der Grad der Schädigung steigt mit der Zunahme der Temperaturen, der Einwirkungsdauer und der Häufigkeit der Manipulationen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen, die praxisrelevante Manipulationen von tiefgefrorenen Pailletten auf die Qualität und Befruchtungsfähigkeit von Bullensperma haben können, untersucht. Den Schwerpunkt bilden die Aufbewahrung im Container, der Auftau-prozeß und der Aufenthalt bis zur Insemination. Als Spermienpara-meter wurden neben den herkömmlichen Merkmalen der Adenosinnu-cleotidgehalt der Spermien und der Prozentsatz intakter Akrosome herangezogen. Darüberhinaus wurde der Temperaturverlauf im Inne-ren der Paillette erfaßt.

1. Mit sog. Trockenauftaumethoden ($+38^{\circ}\text{C}/3$ Minuten im "Sperma-therm" nach Dr. Schille bzw. Auftauen in einem Mikrowellenherd) wurden signifikant niedrigere Auftauergebnisse erzielt ($P \leq 0,05$), als mit Wasserbädern (z.B. $+40^{\circ}\text{C}/30$ Sekunden und $+75^{\circ}\text{C}/9$ Sekunden). Die Auftauzeit, berechnet in Sekunden bis zum Errei-chen von 0°C , war im "Spermatherm" um das 6- bis 10-fache verlän-gert. Beide Verfahren sind derzeit für den praktischen Einsatz ungeeignet.

2. Nach Variationen der Auftauzeit und -temperatur im Wasserbad bestanden zwischen den einzelnen Verfahren ($+75^{\circ}\text{C}/9$ Sekunden, $+40^{\circ}\text{C}/30$ Sekunden, $+35^{\circ}\text{C}/13$ Sekunden, $+20^{\circ}\text{C}/20$ Sekunden) deutli-che Unterschiede in der Spermaqualität. Methoden mit Samenendtem-peraturen im Bereich der Körpertemperatur ($+75^{\circ}\text{C}/9$ Sekunden, $+40^{\circ}\text{C}/30$ Sekunden) erzielten bessere Auftauergebnisse als solche,

die zu Temperaturen um $+5^{\circ}\text{C}$ bis $+6^{\circ}\text{C}$ führen ($+35^{\circ}\text{C}/13$ Sekunden, $+20^{\circ}\text{C}/20$ Sekunden).

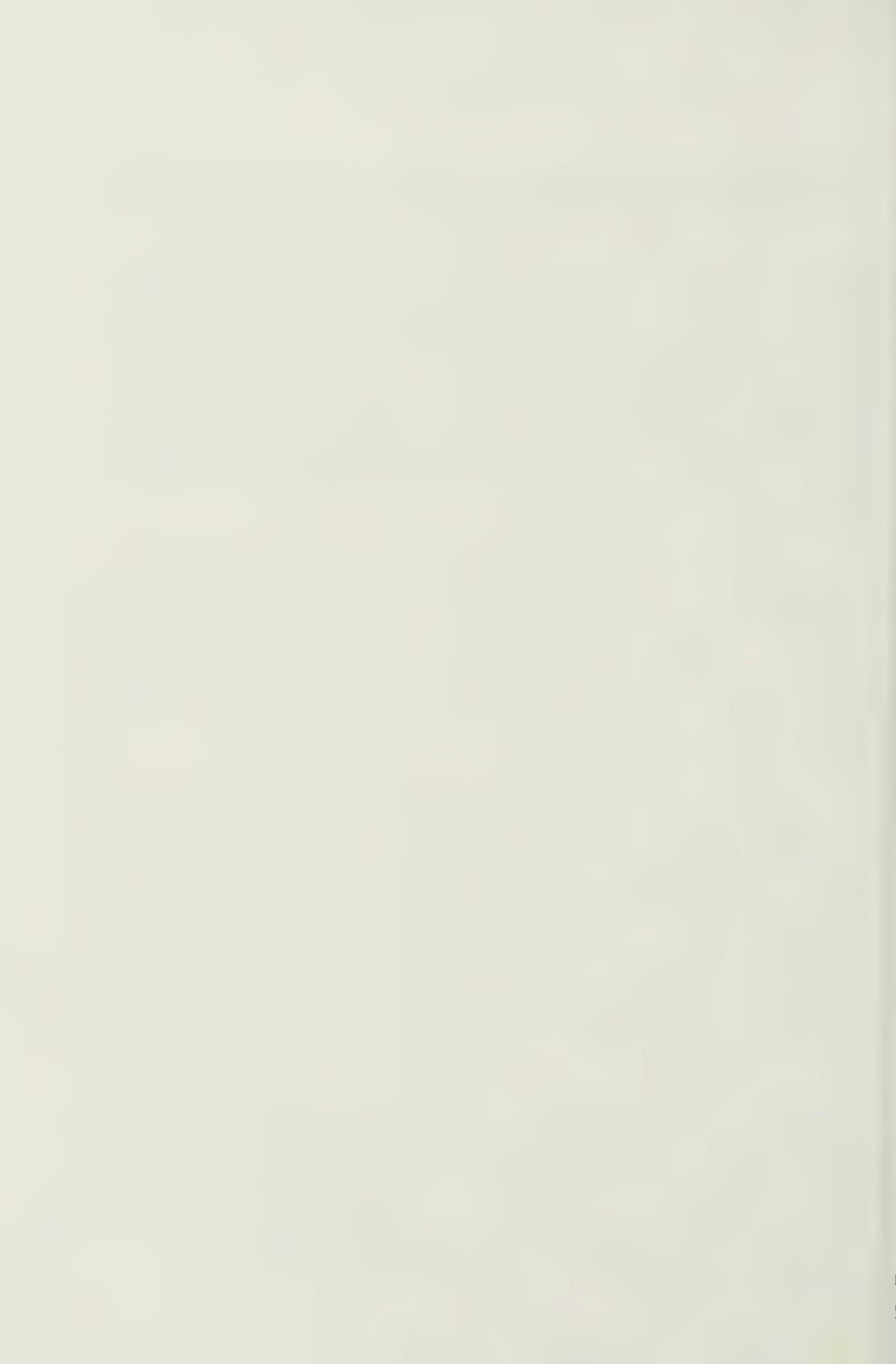
3. Der Vergleich einer Auftaumethode mit hoher ($+40^{\circ}\text{C}/30$ Sekunden) und niedriger Samenendtemperatur ($+35^{\circ}\text{C}/13$ Sekunden) in einem Besamungsversuch (12800 bzw. 13312 Erstbesamungen) ergab hinsichtlich der 60/90 Tage Non-Return-Rate (NRR) eine Differenz von 0,7 % zugunsten des ersten Verfahrens ($P > 0,05$).

4. Pailletten, die nach dem Auftauen ($+40^{\circ}\text{C}/30$ Sekunden) einer Umgebungstemperatur von $+5^{\circ}\text{C}$ in der Luft bzw. (nach anschließen der Erwärmung auf ca. $+27^{\circ}\text{C}$) im Cassougerät für jeweils 1 Minute ausgesetzt waren, wiesen im Vergleich zur Kontrolle ($+40^{\circ}\text{C}/30$ Sekunden) keine Beeinträchtigung der Spermaqualität auf ($P > 0,05$).

5. Manipulationen der Pailletten im Stickstoffbehälter mit Erhöhung der Temperaturen auf -60°C bis -5°C für 1, 10 und 60 Minuten, mit nachfolgendem erneuten Eintauchen in flüssigen Stickstoff bzw. weiterem Auftauen, führten zu einer Beeinträchtigung der Spermaqualität. Der Grad der Schädigung stieg mit der Erhöhung der Temperatur, der Verlängerung der Einwirkungsdauer und der erneuten Abkühlung auf -196°C an.

6. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß durch Variation in der Handhabung von tiefgefrorenem Bullensperma in Paillettenform, die Spermaqualität beeinflußt wird. Durch geeignete Modifikationen der Auftaumethoden und der Handhabung der Pailletten in der Phase

zwischen Auftauen und Insemination, können auch beim gegenwärtigen Stand der Technik weitere Verbesserungen der Resultate hinsichtlich der Spermaqualität und der Besamungsergebnisse erzielt werden. Um die z.T. nur geringen Unterschiede der Spermabeschaffenheit verifizieren zu können, sind neben den herkömmlichen, meist subjektiven Verfahren der Spermauntersuchung weitere, objektive Methoden erforderlich. Die in dieser Arbeit verwendeten Parameter (Adenosinnucleotidgehalt der Spermien, AEC-Wert) scheinen für diesen Zweck geeignet.



6. SUMMARY

"Investigations of deep-frozen bull semen from preservation in a container to insemination with special consideration of defined experimental noxes"

This thesis deals with the effects of practice-relevant manipulations of deep-frozen straws on the quality and fertility of bull semen. The influence of the method of preservation, the thawing process and the time until insemination were examined. Additional to the conventional parameters, the content in adenosinnucleotides of the sperms and the percentage of intact acrosomes was calculated. Furthermore the temperature inside the straw was continuously monitored.

1. Thawing without a waterbath (+38°C for 3 minutes in the "spermatherm" by Dr. Schille or thawing in a microwave oven) resulted in significantly lower values ($P \leq 0,05$), than thawing in a waterbath (+40°C for 30 seconds and +75°C for 9 seconds). The thawing time calculated as time in seconds taken to reach 0°C was 6 to 10 times longer in the "spermatherm".

2. Variations of the thawing time and -temperature using a waterbath (+75°C for 9 seconds, +40°C for 30 seconds, +35°C for 13 seconds, +20°C for 20 seconds) influenced sperm quality. Methods with a post-thaw temperature of semen near body temperature (+75°C for 9 seconds and +40°C for 30 seconds) resulted in higher

quality and fertility of spermatozoa than those with post-thaw temperatures of +5°C and +6°C (+35°C for 13 seconds, +20°C for 20 seconds).

3. Comparison of a thawing method with high (+40°C for 30 seconds) and lower (+35°C for 13 seconds) post-thaw temperatures in a field trial (12800, 13312 first inseminations resp.) resulted in a difference of 0,7 % in favor of the former method ($P > 0,05$) concerning the 60/90 days non-return-rate (NRR).

4. When straws, after thawing (+40°C for 30 seconds), were held at an ambient temperature of +5°C in the air or (after warming to nearly +27°C) in the cassou equipment resp. for only 1 minute, no adverse effects on sperm quality were seen in comparison to the control (+40°C for 30 seconds: $P > 0,05$).

5. Manipulation of the straws in the N_2 -container raising the temperature to -60°C and -5°C for 1, 10 and 60 minutes, followed by refreezing at -196°C or further thawing, led to a reduction in sperm quality. The degree of damage increased with rising temperatures, prolongation of the time of influence and refreezing once more to -196°C.

6. The present results show that the handling of deep-frozen bull semen in straws influences sperm quality. Sperm quality and conception rates could be improved by a qualified modification of the thawing techniques presently available and the improved hand-

ling of the straws mainly in the phase between thawing and insemination. To verify the minimal differences in sperm quality, more objective methods of sperm examination should be used besides the common mostly subjective ones. Parameters used in this work (adenosinnucleotide content of the sperm, AEC-value) appear qualified for this purpose.



7. LITERATURVERZEICHNIS

ALMQUIST, J.O. (1976a):

Sperm survival not affected when straws thawed at very high temperatures.

A.I.Digest 24, 6.

ALMQUIST, J.O. (1976b):

Effect of cold shock after thawing and acrosomal maintenance and motility of bovine spermatozoa in plastic straws.

J.Dairy Sci. 59, 1825-1829.

ALMQUIST, J.O. and H.B. WIGGIN (1973a):

Effect of different combinations of freezing and thawing rates upon survival of bull spermatozoa in U.S. plastic straws.

A.I.Digest 21, 10-11.

ALMQUIST, J.O. and H.B. WIGGIN (1973b):

Survival of bull spermatozoa frozen and thawed by different methods in plastic straws.

A.I.Digest 21, 12-15.

ALMQUIST, J.O., J.L. ROSENBERGER and R.J. BRANAS (1979):

Effect of thawing time in warm water on fertility of bovine spermatozoa in plastic straws.

J.Dairy Sci. 62, 772-775.

ALMQUIST, J.O., K.E. GRUBE and J.L. ROSENBERGER (1982):

Effect of thawing time on fertility of bovine spermatozoa in French straws.

J.Dairy Sci. 65, 824-827.

AMELAR, R.D., L. DUBIN and C. SCHOENFELD (1980):

Sperm motility.

Fert.Steril. 34, 197-215.

ARBEITER, E. (1977):

Schadeinflüsse auf Tiefkühlsperma vom Rind durch Aufbewahrung und Manipulation unter Praxisbedingungen.

Vet.med.Diss., Wien.

ATKINSON, D.E. and G.M. WALTON (1967):

Adenosintriphosphate conservation in metabolic regulation.

J.Biol.Chem. 242, 3239-3241.

BADER, H. (1971):

Untersuchungen über morphologische Samenzellschädigungen bei der Tiefgefrierung von Bullensperma.

Zuchthyg. 2, 82.

BERGER, W. (1983):

Spermabeurteilung mit Hilfe der Biolumineszenzmessung von ATP, ADP und AMP.

Vet.med.Diss., München.

BEUTEL, P., H. KÜFFNER und W. SCHUBÖ (1980):
SPSS 8 Statistik-Programm-System für die Sozialwissenschaften,
3. Aufl., Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York.

BRACKETT, B.G. and W.L. WILLIAMS (1967):
ATP content of spermatozoa, semen and seminal plasma.
Proc.Soc.Exp.Biol. 125, 1133-1136.

BROOKS, D.E. (1970):
Observation in the content of ATP and ADP in bull spermatozoa
using the firefly luciferase system.
J.Reprod.Fert. 23, 525-528.

BROOKS, D.E. (1971):
Nucleotides in spermatozoa.
J.Reprod.Fert. 25, 302-303.

BROWN, J.C., P.C. SENGGER and J.K. HILLERS (1982):
Influence of thawing time and post-thaw temperature on acrosomal
maintenance and motility of bovine spermatozoa frozen in .5 ml
French straws.
J.Anim.Sci. 54, 938-944.

CHANDLER, J.E., R.W. ADKINSON and R.L. NEBEL (1984):
Thawing optimums for bovine spermatozoa processed by three
methods and packaged in Continental and French straws.
J.Dairy Sci. 67, 398-404.

CHAPMAN, A.G., L. FALL and D.E. ATKINSON (1971):
Adenylate energy charge in escherichia coli during growth and
starvation.
J.Bact. 108, 1072-1086.

CHAPMAN, A.G. and D.E. ATKINSON (1977):
Adenine nucleotide concentrations and turnover rates.
Adv.Microb.Phys. 15, 297-301.

DE ABREU, R.M., W.E. BERNDTSON, R.L. SMITH and B.W. PICKETT
(1979):
Effect of post-thaw warming on viability of bovine spermatozoa
thawed at different rates in French straws.
J.Dairy Sci. 62, 1449-1454.

DORN, F. und F. BADER (1976):
Physik, 84-87, Verlag Schroedel KG, Hannover.

DOTT, A.M. and G.C. FORSTER (1975):
Preservation of differential staining of spermatozoa by formole
citrate.
J.Reprod.Fert. 45, 57-60.

ENNEN, B.D., W.E. BERNDTSON, R.G. MORTIMER and B.W. PICKETT
(1976):
Effect of processing procedures on motility of bovine spermatozoa
frozen in 0.25 ml straws.
J.Anim.Sci. 43, 651-656.

- FOULKES, J.A. and B.J. MacDONALD (1979):
The relationship between ATP content and motility of bovine spermatozoa.
Theriogenology 11, 313-319.
- GIBBONS, B.H. and I.R. GIBBONS (1979):
Relationship between the latent adenosine triphosphatase state of dynein 1 and its ability to recombine functionally with KCl-extracted searching sperm flagella.
J.Biol.Chem. 254, 197-201.
- GILBERT, G.R. and J.O. ALMQUIST (1978):
Effects of processing procedures on post-thaw acrosomal retention and motility of bovine spermatozoa packaged in 0.3 ml straws at room temperature.
J.Anim.Sci. 46, 225-231.
- GOOSSENS, J.M.M. (1972):
Biophysikalische Prozesse bei der Spermatiefgefrierung.
VII.Int.Kongr.tier.Fortpfl.künstl.Bes., 1, München, 166-171.
- GREAVES, R.J.N., J. NAGINGTON and T.D. KELLAWAY (1963):
Preservation of living cells by freezing and by drying.
Fed.Proc. 22, 1 (zit. nach GOOSSENS, J.M.M. 1972).
- HAFEZ, E.S.E. (1980):
Reproduction in farm animals, 184-186, 4. Aufl., Verlag Lea & Fibiger, Philadelphia.
- HAHN, J. und D. KRAUSE (1964):
Über die Beziehungen zwischen Sameneigenschaften und Befruchtungsergebnissen von Besamungsbullen.
V.Int.Kongr.tier.Fortpfl.künstl.Bes. 4, Trient, 535-539.
- HAHN, R. (1968):
Zur Technik des TGN₂-Samens; hier Handhabung und Temperaturverhältnisse der Stickstoffbehälter.
Zuchthyg. 3, 14-21.
- HANCOCK, J.L. (1952):
The spermatozoa of sterile bulls.
J.Exp.Biol. 30, 50-56.
- HEUER, J.L. (1980):
Versuche zur Tiefgefrierung von Wasserbüffelsperma unter Anwendung des Filtertestes zur Samenbeurteilung.
Vet.med.Diss., Hannover.
- HOCKE, P. (1982):
Persönliche Mitteilung über festgestellte Fehler mit dem Umgang der Paillette.
- HOLM-HANSEN, O. and D. KARL (1978):
Biomass and adenylate energy charge determination in microbial cell extracts and environmental samples.
In: DELUCA, M.A., Methods in enzymology, 73-85, 57. Aufl., Acad. Press, New York, San Francisco, London.

HOSKINS, D.D. (1972):

Adenine nucleotide mediation of fructolysis and motility in bovine epididymal spermatozoa.

J.Biol.Chem. 248, 1135-1140.

KÄHN, W. (1981a):

Zur ATP-, ADP- und AMP-Bestimmung mit dem Biolumineszenzverfahren im Sperma einiger Haustiere und des Menschen.

Vet.med.Diss., München.

KÄHN, W. (1981b):

Zum ADP- und AMP-Nachweis im Sperma mit dem Biolumineszenzverfahren.

Zuchthyg. 16, 76.

KÄHN, W., J. PFETSCH und W. LEIDL (1982):

ATP-, ADP- und AMP-Gehalt von Spermien einiger Haustiere und des Menschen sowie von Bullenspermien während der Tiefgefrierkonservierung.

Zuchthyg. 17, 49-55.

KARRAS, W. (1950):

1. Mitteilung: Eine Methode zur färbereichen Darstellung der Kopfkappen und des Kolloidüberzuges der Spermien.

Mhefte prakt.Tierheilkd. 2, 162-167.

KRAUSE, D. (1966):

Untersuchungen am Bullensperma unter Berücksichtigung der fertilitätsdiagnostischen Bedeutung der Befunde.

Habil.-Schr., Hannover.

KRÜGER, B. (1972):

Untersuchungen der Beziehungen verschiedener Wärme-Resistenz-Tests zur Fruchtbarkeit von Bullensperma.

Vet.med.Diss., Hannover.

KUPFERSCHMIED, H. und C. GAILLARD (1981):

Auftauzeiten von Rindersamen in feinen Pailletten und Nonreturn-rate.

Schweiz.Arch.Tierheilk. 123, 515-522.

LEIDL, W. (1980):

Aspekte aus der Spermatologie.

XXX.Int.Fachtagung "Fortpflanzung und Besamung", Wels, Österreich.

LOTTHAMMER, K.-H. (1980):

Erfahrungen mit Betriebsanalysen bei bestandsweise auftretenden Gesundheits- und Fruchtbarkeitsstörungen in Milchrinderherden.

Korrekturen, Ergebnisse, Folgerungen.

Tierzüchter 32, 275-277.

LUYET, B.Y. (1957):

On the growth of the ice physe in aquas colloids.

Proc.Roy.Soc.London B, 147, 434 (zit. nach GOOSSENS, J.M.M. 1972).

MERKT, H., J. HANNIG, H. BADER und K.F. WEITZE (1971):
Verhalten von Bullenspermien bei der Tiefgefrierkonservierung.
Dtsch.tierärztl.Wschr. 78, 127-129.

NEBEL, R.L., J.E. CHANDLER, A.D. WEISGOLD and R.W. ADKINSON
(1979):

The effect of thawing temperature and time on seminal quality in
0.5 ml French straws (bull).

J.Anim.Sci. 49, Suppl. 1, 320-321.

NEVO, A.C. and R. RIKMENSPOEL (1969):

Diffusion of ATP in sperm flagella.

J.theor.Biol. 26, 11-18.

NEWTON, A.A. and F.R.S. LORD ROTHSCCHILD (1961):

Energy-rich phosphate compounds in bull semen: comparison of
their metabolism with anaerobic heat production and impedance
change frequency.

Proc.Roy.Soc. B 155, 183-194.

NIMTZ, G. (1980)

Mikrowellen: Einführung in Theorie und Anwendung

Verlag Carl Hauser, München, Wien.

PACE, M.M., J.J. SULLIVAN, F.I. ELLIOT, E.F. GRAHAM and G.H.
COULTER (1981):

Effects of thawing temperature, number of spermatozoa and sperma-
tozoal quality on fertility of bovine spermatozoa packaged in
0.5-ml French straws.

J.Anim.Sci. 53, 693-701.

PAPA, F.O. (1982):

Motilität und Akrosomintegrität als Fruchtbarkeitsparameter
tiefgefrorenen Bullenspermias in Abhängigkeit von verschiedenen
Auftauverfahren unter Berücksichtigung von Kälteschock-, Thermo-
resistenz- und Sephadexfiltrertest.

Vet.med.Diss., Hannover.

PAPA, F.O. und D. KRAUSE (1981):

Einfluß der Auftautemperatur auf Motilität, Akrosomintegrität und
Thermoresistenz von tiefgefrorenem Bullensperma, "Minitüb-Ver-
fahren".

Zuchthyg. 2, 89.

PFETSCH, J. (1979):

Zur ATP-Bestimmung im Sperma einiger Haustierarten mit dem
Biolumineszenzverfahren.

Vet.med.Diss., München.

PICKETT, B.W. and W.E. BERNDTSON (1974):

Preservation of bovine spermatozoa by freezing in straws: a
review.

J.Dairy Sci. 57, 1287-1301.

PILCH, J. (1980):

Observations on the influence of sub-zero temperatures (-12° to
-80°C) on bull semen motility after thawing.

Proc.IX.Int.Congr.Anim.Reprod.Artif.Insem. 5, Madrid, 379-382.

PRINZEN, R. (1977):

ATP-Bestimmung mit einer Schnellmethode an frischen und tiefgefrorenen Bullenspermien.

Zuchthyg. 12, 105-108.

PURSEL, V.G., L.A. JOHNSON and G.B. RAMPACEK (1972):

Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock.

J.Anim.Sci. 34, 278-283.

REINHARD, R. (1980):

Untersuchungen über Zusammenhänge zwischen spermatologischen Befunden von Bullenejakulaten und den Befruchtungsergebnissen im Besamungseinsatz.

Vet.med.Diss., Berlin.

ROBBINS, R.K., L.E. GERBER and R.G. SAACKE (1972):

Influence of thaw rate on maintenance of the acrosomal cap.

J.Anim.Sci. 35, 253 (Abstr.).

ROBBINS, R.K., R.G. SAACKE and P.T. CHANDLER (1976):

Influence of freeze rate, thaw rate and glycerol level on acrosomal retention and survival of bovine spermatozoa frozen in French straws.

J.Anim.Sci. 42, 145-154.

RUMM-KREUTER, D. (1983):

Das Mikrowellengerät.

Feld & Wald 11, 9-10.

SAACKE, R.G. (1970):

Morphology of sperm and its relationship to fertility.

Proc.III.Tech.Conf.Artif.Insem.Anim.Reprod., NAAB, Chicago, 17-30.

SAACKE, R.G. (1978):

Factors affecting spermatozoan viability from collection to use.

Proc.IX.Tech.Conf.Artif.Insem.Reprod., NAAB, Columbia, 3-9.

SAACKE, R.G. and R.P. MARSHALL (1968):

Observations on the acrosomal cap of fixed and unfixed bovine spermatozoa.

J.Reprod.Fert. 16, 511-514.

SAACKE, R.G., R.P. AMANN and C.E. MARSHALL (1968):

Acrosomal cap abnormalities of sperm from subfertile bulls.

J.Anim.Sci. 27, 1391-1400.

SAACKE, R.G. and J.M. WHITE (1972):

Semen quality tests and their relationship to fertility.

Proc.IV.Tech.Conf.Artif.Insem.Anim.Reprod., NAAB, Chicago, 22-27.

SAACKE, R.G., R.K. ROBBINS and P.T. CHANDLER (1974):
Effect of freeze rate, thaw rate and glycerol level on bovine sperm frozen in straws.
Proc.V.Tech.Conf.Artif.Insem.Reprod., NAAB, 41-46.

SAACKE, R.G., C.E. MARSHALL, W.E. VINSON, M.L. O'CONNOR, J.E. CHANDLER, J. MULLINS, R.P. AMANN, R.A. WALLACE, V.N. VINCEL and H.C. KELLGREEN (1980):
Semen quality and heterospermic insemination in cattle.
Proc.IX.Int.Congr.Anim.Reprod.Artif.Insem., 3, Madrid, 285 (Abstr.).

SALISBURY, G.W. and N.L. VANDEMARK (1961):
Physiology of reproduction and artificial insemination of cattle.
W.H. Freeman & Co., San Francisco, London.

SATIR, P. (1979):
Basis of flagellar motility in spermatozoa: current status.
In: Spermatozoon, 81-90, Eds.: FAWCETT, D.W. and J.M. BEDFORD, Urban & Schwarzenberg, Baltimore - Munich.

SCHILLE (1977):
"Spermatherm": Ein elektronisch gesteuertes Trockenauftaugerät für tiefgefrorenes Sperma in Pailletten.
Der prakt.Tierarzt 7, 496-497.

SENGER, P.L. (1980):
Handling frozen bovine semen - factors which influence viability and fertility.
Therlogenology 13, 51-62.

SENGER, P.L., W.C. BECKER and J.K. HILLERS (1976):
Effect of thawing rate and post-thaw temperatures on motility and acrosomal maintenance in bovine semen frozen in plastic straws.
J.Anim.Sci. 42, 932-936.

SWEDES, J.S., R.J. SEDO and D.E. ATKINSON (1975):
Regulation of growth and protein synthesis to the adenylate energy charge in an adenine requiring mutant of escherichia coli.
J.Biol.Chem. 250, 6930-6938.

VELEZ CUEVAS, G. (1982):
Untersuchungen über die Eignung des ATP-, ADP- und AMP-Nachweises mit der Biolumineszenzmethode zur Beurteilung von Tiefgefrierkonservierungsverfahren für Bullenspermien.
Vet.med.Diss., München.

VOSS, W.A.G. (1974):
Mikrowellenerwärmung.
Elektrowärme, Theorie und Praxis, 667-693, Verlag W. Girardet, Essen.

WEITZE, K.F. (1981):
Tiefgefrierkonservierung von Kaninchensperma.
Zuchthyg. 16, 212-218.

WELLS, M.E. and O.A. AWA (1970):

New technique for assessing acrosomal characteristics of spermatozoa.

J.Dairy Sci. 53, 227-232.

WIGGIN, H.B. and J.O. ALMQUIST (1975):

Effect of glycerol equilibration time and thawing rate upon acrosomal maintenance and motility of bull spermatozoa frozen in plastic straws.

J.Anim.Sci. 40, 302-305.

LEBENS LAUF

Am 28. August 1951 wurde ich als Sohn des Arztes für Allgemeinmedizin Dr. Hans Klein und seiner Ehefrau Inge, geb. Luksch geboren.

Nach vierjähriger Volksschulzeit in Uffenheim/Großkreis Neustadt/A.-Bad Windsheim wechselte ich 1962 auf das neusprachliche Christian-von-Bomhard-Gymnasium über. Im Jahre 1968 trat ich dann in das naturwissenschaftliche Gymnasium der Schloß-Schule Kirchberg/J. über, wo ich im Juni 1972 die Reifeprüfung ablegte.

Im Wintersemester 1972/73 begann ich mit dem Studium der Agrarbiologie an der landwirtschaftlichen Hochschule Hohenheim, das ich im Frühjahr 1977 mit dem Diplom beendete.

Anschließend nahm ich im Wintersemester 1977/78 das Studium der Tiermedizin an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München auf. Im Herbst 1981 legte ich dort das tierärztliche Staatsexamen ab und erlangte im Januar 1982 die Approbation als Tierarzt.

Mit der Anfertigung vorliegender Arbeit begann ich im Mai 1982.

Der experimentelle Teil der Dissertation wurde in der Besamungszentrale des Besamungsvereins Neustadt a.d. Aisch e.V. von August 1982 bis Juli 1983 durchgeführt.

Seit Januar 1984 bin ich Assistent in der Großtierpraxis bei Dr. T. Wolf in Wiesenbronn.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. W. Leidl für die Überlassung des Themas und die stets gewährte Unterstützung.

Bei den Direktoren des Besamungsvereins Neustadt/a.d.Aisch e.V., Herrn Dr. R. Hahn und Herrn W. Breuer möchte ich mich für die Möglichkeit zur Durchführung der Versuche sowie für die finanzielle Unterstützung aus Mitteln der Dr.Dr.h.c. Karl-Eibl-Stiftung bedanken.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. W. Kähn für die Einführung in die Technik der Biolumineszenzmessung und Herrn Dr. P. Hocke für seine Beratung zur praktischen Durchführung der Versuche.

Dank für die stets gewährte Unterstützung auch an Herrn Dr. Lorrmann, Herrn Dr. Zoder und das Laborpersonal in der Besamungszentrale Neustadt/a.d.Aisch.

Bedanken möchte ich mich vor allem auch bei Herrn Prof. Dr. Osterkorn von der Ludwig-Maximilians-Universität München, für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Meßergebnisse und nicht zuletzt bei Herrn Dr. Dr. habil. R. Stolla für die Durchsicht der Arbeit und bei Frau B. Schüssler für die unermüdliche Hilfe bei der redaktionellen Ausarbeitung.

